



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA DA *LEGIONELLA*
PNEUMOPHILA APÓS CULTURA EM *ACANTHAMOEBA*
CASTELLANII

CARLA VANEISSA NÓBREGA CARNEIRO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

MARÇO 2014



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA DA *LEGIONELLA*
PNEUMOPHILA APÓS CULTURA EM *ACANTHAMOEBA*
CASTELLANII

CARLA VANESSA NÓBREGA CARNEIRO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ORIENTADORA:

Prof. Doutora Maria Teresa Marques

CO-ORIENTADORA:

Mestre Maria de Jesus Chasqueira

Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Nova de Lisboa

MARÇO 2014

Poster

Chasqueira, M. J., Rodrigues, L., Carneiro, C. e Marques, T. (2012). Papel da *Acanthamoeba castellanii* na modulação da expressão génica da *Legionella pneumophila*. XI Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica, Porto, 12-15 Dezembro, 2012.

Agradecimentos

À Professora Doutora Teresa Marques, por ter aceitado o meu pedido de orientação, pelos ensinamentos, pela boa disposição e por todo o cuidado e empenho na correcção desta tese.

À Mestre Maria de Jesus Chasqueira, pela imensa paciência, ajuda inestimável e transmissão de conhecimentos. Por todo o rigor e cuidado na correcção desta longa tese, por todas as “dicas” e “puxões de orelha”. O meu sincero obrigado.

À Lúcia, pelas gargalhadas e ajuda imprescindível ao longo deste ano de trabalho.

À D. Elisa, à D. Regina e à Otilia, funcionárias do departamento de Microbiologia, com as quais tive a oportunidade de partilhar muitos momentos de lazer e boa disposição.

À minha “pandilha”: João, Hugo, Andreia, Pedro, Luís e Sofia, companheiros de noitadas, companheiros de confiança, companheiros de hoje e amanhã. Obrigada!

A todos os meus colegas de trabalho, em especial ao Ricardo, à Elisabete, à Sofia, à Luísa, à Carla Duarte, à Ju, à Clara e ao David. Obrigada pelo vosso apoio incondicional e pela amizade que conseguimos construir para além dos muros da Faculdade. Guardo-vos a todos num enorme sorriso.

À Margarida Simões, que posso eu dizer? És um moinho de força, és inspiração, és amizade em estado puro. “Tamos juntas!”.

À Carolina Merino, pela paciência gigante, pela amizade sincera e carinho que nunca mais esquecerei. O teu contributo será, para sempre, inesquecível. “Dormirei”!

Aos meus pais, o meu centro, a minha força, a minha motivação. Adoro-vos do fundo do coração. E ao meu irmão, o meu “Bigodes”, que apesar de novo já tem alma e tamanho de gigante. Adoro-te puto =>!

Finalmente, mas nunca menos importante, à minha amiga Professora Cristina Lobo Vilela. Nunca terei palavras para lhe agradecer o quanto fez por mim nem o quanto ainda faz. Obrigada por acreditar e por nunca me fazer esquecer que vale sempre a pena.

Esta tese é dedicada a si.

Até sempre...*

Resumo

A *Legionella pneumophila* (Lp) é um microrganismo patogénico intracelular capaz de infectar protozoários e macrófagos alveolares. A transição do ambiente extracelular para o intracelular requer a activação de programas transcricionais que coordenam a transição da Lp da fase replicativa para a fase transmissiva. Contudo, o conhecimento sobre os factores necessários para a proliferação intracelular e a adaptação a diferentes ambientes é ainda bastante escasso.

Este trabalho teve como objectivos o estudo da expressão génica de Lp Paris antes e após infecção em *Acanthamoeba castellanii* (Ac), ao longo de um e dois ciclos de infecção de 24 h, e a compreensão da dinâmica de crescimento ao longo dos mesmos.

Registaram-se baixas percentagens de internalização em Ac, tanto no início do primeiro como do segundo ciclo. Contudo, o número de microrganismos foi elevado no fim dos ciclos e a dinâmica de multiplicação intracelular durante o segundo ciclo aparenta ser menor do que no primeiro.

O número de ciclos infecciosos não altera a sensibilidade da Lp ao sódio. Em relação à resistência ao choque osmótico, apenas a suspensão de inoculação demonstrou sinais de sensibilidade, ao contrário das suspensões resultantes do primeiro e segundo ciclo.

Do estudo da expressão génica, concluiu-se que infecções realizadas com Lp em fase estacionária precoce e tardia apresentam padrões de modulação distintos. Durante os dois ciclos de 24 h com Lp em fase estacionária precoce e tardia, observou-se indução de 6 genes e repressão de 3, respectivamente. Porém, os níveis de expressão génica não se mantêm estáveis, apresentando variações entre ciclos.

Até ao momento, desconhece-se o impacto da variação da expressão génica dos genes em análise sobre a virulência desta bactéria e nos eventuais processos de infecção do hospedeiro humano. Como tal, torna-se imperativo perceber qual a função destes genes e compreender qual o seu papel no processo de invasão.

Abstract

Legionella pneumophila (Lp) is a pathogenic agent able to infect protozoa and alveolar macrophages. The transition from extracellular to intracellular environment requires the activation of transcriptional and phenotypic programs. These programs coordinate the Lp's transition from replicative to transmissive phase. However, our knowledge about the factors needed for the intracellular proliferation and adaptation to different environments is still scarce.

This study's objectives were to evaluate the gene expression of Lp Paris before and after infection in *Acanthamoeba castellanii* (Ac), over one and two cycles of infection of 24 hours, and the understanding of the growth dynamics during these cycles.

Low rates of internalization were registered in Ac, both at the beginning of the first and second cycle. However, the number of microorganisms was high at the end of the cycle and the dynamics of intracellular multiplication during the second cycle appears to be less than the first.

The number of infectious cycles does not change the Lp's sensitivity to sodium. To what concerns to osmotic shock resistance, only the inoculation suspension showed sensitivity, contrary to the suspension resulting from the first and second cycles.

From the study of gene expression, it was concluded that infection with Lp performed with early and late stationary phase exhibit distinct patterns of modulation. During the two cycles of 24 h with Lp in early and late stationary phase, we observed induction of 6 genes and repression of 3, respectively. However, gene expression levels did not remain stable, with variations between cycles.

To the moment the impact of the gene expression variation of the analyzed genes in this bacteria virulence and in the infection process in human hosts is unknown. As such it's imperative to understand what the function of these genes is and to understand their role in the invasion process.

Índice geral

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO.....	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE GERAL.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA	1
1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	3
1.3. CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA <i>LEGIONELLACEAE</i>	4
1.4. PATOGÉNESE – O CICLO DE VIDA INTRACELULAR.....	5
1.5. FACTORES DE VIRULÊNCIA	7
1.6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	9
1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	10
1.7.1. <i>Exame cultural</i>	10
1.7.2. <i>Pesquisa directa de antígeno na urina</i>	12
1.7.3. <i>Pesquisa de antígeno por Imunofluorescência Directa, em amostras respiratórias</i>	13
1.7.4. <i>Diagnóstico serológico</i>	13
1.7.5. <i>Pesquisa de ácidos nucleicos</i>	15
1.8. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA	16
1.8.1. <i>Técnicas de PCR em tempo real</i>	16
1.9. CONTEXTUALIZAÇÃO DO ESTUDO PROPOSTO.....	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1. FLUXOGRAMA – PROTOCOLO DE INFECÇÃO (CICLO DE 24 HORAS)	21
2.2. ESTIRPES	22
2.3. INFECÇÃO – CICLO DE 24 HORAS.....	22
2.3.1. PREPARAÇÃO DO INÓCULO PARA INFECÇÃO EM <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i>	22
2.3.2. <i>Infecção da Acanthamoeba castellanii</i>	23
2.3.3. <i>Colheita e processamento das amostras pós-infecção</i>	23
2.4. FLUXOGRAMA – PROTOCOLO DE INFECÇÃO (CICLO DE 48 HORAS)	24
2.4.1. <i>Reinfecção da Acanthamoeba castellanii</i>	25
2.4.2. <i>Colheita e processamento das amostras pós-infecção</i>	25
2.4.3. ENUMERAÇÃO DOS MICRORGANISMOS VIÁVEIS EM DIFERENTES PONTOS DO CICLO DE INFECÇÃO	26
2.4.4. <i>Determinação do número de UFC/ml da suspensão de inoculação (Ponto I)</i>	26
2.4.5. <i>Determinação do número de Lp fagocitadas e presentes no sobrenadante (Pontos II e IV)</i>	27
2.4.6. <i>Determinação do número de UFC/ml após término do ciclo de infecção (Pontos III e V)</i>	27
2.5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DA <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> A FACTORES DE “STRESS”	28
2.5.1. <i>Sensibilidade ao sódio</i>	28
2.5.2. <i>Sensibilidade ao choque osmótico</i>	28

2.6.	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA O ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA POR PCR EM TEMPO REAL	29
2.6.1.	<i>Extracção, quantificação e avaliação da integridade do ARN total</i>	29
2.6.2.	<i>Tratamento com DNase</i>	29
2.6.3.	<i>Síntese de ADN complementar</i>	30
2.7.	ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA POR PCR EM TEMPO REAL	31
2.7.1.	<i>Seleção dos genes alvo e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores</i>	31
2.7.2.	<i>PCR em tempo real</i>	31
2.7.3.	<i>Análise de dados</i>	32
2.7.4.	<i>Reprodutibilidade intra e inter-ensaio</i>	33
2.7.5.	<i>Estudo da linearidade e da eficiência do PCR em tempo real</i>	33
3.	RESULTADOS	34
3.1.	INFEÇÕES – CICLO DE 24 E 48 H	34
3.2.	ENUMERAÇÃO DOS MICRORGANISMOS VIÁVEIS EM DIFERENTES PONTOS DO CICLO DE INFECÇÃO DE 48 H	35
3.2.1.	<i>Determinação do número de UFC/ml de Lp presentes na suspensão de inoculação (1º ciclo)</i>	35
3.2.2.	<i>Determinação do número de UFC/ml de Lp presentes no sobrenadante e no lisado das amibas após período de adsorção (1º ciclo)</i>	35
3.2.3.	<i>Determinação do número de UFC/ml após término do ciclo de infecção (1º ciclo)</i>	36
3.2.4.	<i>Determinação do número de UFC/ml de Lp presentes na suspensão de inoculação (2º ciclo)</i>	36
3.2.5.	<i>Determinação do número de UFC/ml de Lp presentes no sobrenadante e no lisado após período de adsorção (2º ciclo)</i>	37
3.2.6.	<i>Determinação do número de UFC/ml após término do ciclo de infecção (2º ciclo)</i>	37
3.3.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DA <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> A FACTORES DE “STRESS”	38
3.3.1.	<i>Sensibilidade ao sódio</i>	38
3.3.2.	<i>Sensibilidade ao choque osmótico</i>	39
3.4.	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA O ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA POR PCR EM TEMPO REAL	40
3.4.1.	<i>Avaliação da integridade do ARN total</i>	40
3.4.2.	<i>Eficácia do tratamento com DNase e correcta síntese de ADNc</i>	40
3.5.	ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA POR PCR EM TEMPO REAL	41
3.5.1.	FASE ESTACIONÁRIA PRECOCE – 24 H VS 48 H	41
3.5.1.1.	<i>Fase estacionária tardia – 24 h vs 48 h</i>	44
3.5.2.	<i>Fase estacionária precoce e tardia - 0 h vs 48 h</i>	47
3.5.3.	<i>Estudo da reprodutibilidade intra-ensaio</i>	49
3.5.4.	<i>Estudo da reprodutibilidade inter-ensaio</i>	50
3.5.5.	<i>Estudo da linearidade</i>	51
3.5.6.	<i>Cálculo da eficiência (E)</i>	51
4.	DISCUSSÃO	52
5.	CONCLUSÃO	56
6.	BIBLIOGRAFIA	57
	ANEXO I - PROTOCOLOS DE EXTRACÇÃO DE ARN, “DNASE” E DE CONVERSÃO EM ADN COMPLEMENTAR	XII
	ANEXO II - MEIOS DE CULTURA	XIV
	ANEXO III - MANUTENÇÃO E CONGELAÇÃO DA AMIBA <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i>	XVII
	ANEXO IV - ELECTROFORESE E AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>MIP</i>	XVIII
	ANEXO V - SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	XIX

Lista de abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
Ac	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementar
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensageiro
BCYE	<i>Buffered Charcoal Yeast Extract Agar</i>
BCYE + NaCl	<i>Buffered Charcoal Yeast Extract Agar</i> com Cloreto de Sódio
pb	Par de bases
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Dot/Icm	<i>Defect in organelle trafficking / Intracellular multiplication</i>
DL	Doença dos Legionários
D.O.	Densidade Óptica
DRA	Doença Respiratória Aguda
E	Eficiência de amplificação
ELDESNet	<i>European Legionnaires' Disease Surveillance Network</i>
EWGLI	<i>European Working Group for Legionella Infections</i>
g	Gramma
gyrA	Girase
IFI	Imunofluorescência Indirecta
kDa	kilodalton
L	Litro
LCV	<i>Legionella Containing Vacuole</i>
LE	Legionelose Extrapulmonar
Lp	<i>Legionella pneumophila</i>
M	Molar

MI	Meio de Infecção
<i>mip</i>	<i>macrophage infectivity potentiator</i>
ml	Mililitro
MM	Meio de Multiplicação
MOI	Multiplicidade de Infecção
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de Hidrogénio iónico
ppGpp	3', 5' – bispirofosfato
QA	Quantificação Absoluta
QR	Quantificação Relativa
ARNr	Ácido Ribonucleico ribossomal
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	PCR em tempo-real
Sg	Serogrupo
T.A.	Temperatura ambiente
Tampão TBE	Tampão Tris Borato EDTA
UFC	Unidade Formadora de Colónias
U.V.	Ultra-Violeta
V	Volts

Índice de figuras

FIGURA 1 – CAPA DO PROGRAMA DA CONVENÇÃO NO ESTADO DA PENSILVÂNIA, EM 1976.....	1
FIGURA 2- CARACTERIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DISPONÍVEIS PARA O CÁLCULO DA EXPRESSÃO GÉNICA. (WONG & MEDRANO, 2005).	19
FIGURA 3 – ELABORAÇÃO DAS DILUIÇÕES E INOCULAÇÃO EM MEIO DE BCYE-A	26
FIGURA 4 – ELECTROFORESE DE TRÊS EXTRACTOS DE ARN TOTAL	40

Índice de tabelas

TABELA 1 – PARÂMETROS PARA O DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	31
TABELA 2 - PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO AO LONGO DE UM E DOIS CICLOS DE INFECÇÃO DE 24 H.....	34
TABELA 3 - NÚMERO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NA SUSPENSÃO DE INOCULAÇÃO.	35
TABELA 4 - NÚMERO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO SOBRENADANTE E NO LISADO, APÓS PERÍODO DE ADSORÇÃO, NO INÍCIO DO PRIMEIRO CICLO.....	35
TABELA 5 – NÚMERO DE MICRORGANISMOS NO FIM DO PRIMEIRO CICLO DE INFECÇÃO.....	36
TABELA 6 - NÚMERO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NA SUSPENSÃO DE INOCULAÇÃO DO SEGUNDO CICLO (500 µL DE SUSPENSÃO PROVENIENTES DO FIM DO PRIMEIRO CICLO DE INFECÇÃO – TABELA 4).	36
TABELA 7 - NÚMERO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO SOBRENADANTE E NO LISADO, APÓS PERÍODO DE ADSORÇÃO, NO INÍCIO DO SEGUNDO CICLO.	37
TABELA 8 - NÚMERO DE MICRORGANISMOS NO FIM DO SEGUNDO CICLO DE INFECÇÃO.	37
TABELA 9 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA LP AO SÓDIO NA SUSPENSÃO DE INOCULAÇÃO.	38
TABELA 10 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA LP AO SÓDIO APÓS TÉRMINO DO PRIMEIRO CICLO DE REPLICAÇÃO.	38
TABELA 11– AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA LP AO SÓDIO APÓS TÉRMINO DO SEGUNDO CICLO DE REPLICAÇÃO.	38
TABELA 12 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA LP AO CHOQUE OSMÓTICA NA SUSPENSÃO DE INOCULAÇÃO.	39
TABELA 13 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA LP AO CHOQUE OSMÓTICO APÓS TÉRMINO DO PRIMEIRO CICLO DE REPLICAÇÃO.	39
TABELA 14 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA LP AO CHOQUE OSMÓTICO APÓS TÉRMINO DO SEGUNDO CICLO DE REPLICAÇÃO.	39
TABELA 15– VALORES DE Ct APÓS INFECÇÃO DA AC COM LP EM FASE ESTACIONÁRIA PRECOCE. MÉDIA CALCULADA COM BASE EM 6 (0 H E 24 H) OU 3 (48 H) ENSAIOS. (Σ – CÁLCULO DO DESVIO PADRÃO; C_v – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO EM %: $\Sigma/\text{MÉDIA} \times 100$).....	42
TABELA 16 – VALORES DE Ct APÓS INFECÇÃO DA AC COM LP EM FASE ESTACIONÁRIA TARDIA. MÉDIA CALCULADA COM BASE EM 6 (0 H E 24 H) OU 1 (48 H) ENSAIOS. (Σ – CÁLCULO DO DESVIO PADRÃO; C_v – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: $\Sigma/\text{MÉDIA}$ $\times 100$).	45
TABELA 17 - ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE INTRA-ENSAIO DE CINCO GENES (<i>GYRA</i> , <i>LPP1177</i> , <i>LPP2607</i> , <i>LPP0845</i> E <i>LPP0972</i>) PELA DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (C_v DO TRIPLICADO DE CADA DILUIÇÃO) DE CADA UM DOS TRÊS ENSAIOS (E1, E2 E E3). (C_t – MÉDIA DOS VALORES DE Ct DO TRIPLICADO DE CADA DILUIÇÃO; Σ – DESVIO PADRÃO DO TRIPLICADO DOS VALORES DE Ct).	49
TABELA 18 - ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE INTER-ENSAIO DE CINCO GENES (<i>GYRA</i> , <i>LPP1177</i> , <i>LPP2607</i> , <i>LPP0845</i> E <i>LPP0972</i>) ATRAVÉS DO CÁLCULO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO RESULTANTE DA MÉDIA DE TRÊS ENSAIOS. (C_t – MÉDIA DOS VALORES DE Ct DE TRÊS ENSAIOS; Σ – DESVIO PADRÃO DOS VALORES DE Ct DE TRÊS ENSAIOS).	50
TABELA 19 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO LINEAR DOS GENES <i>GYRA</i> , <i>LPP1177</i> , <i>LPP2607</i> , <i>LPP0845</i> E <i>LPP0972</i>	51
TABELA 20 - CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES: <i>GYRA</i> , <i>LPP1177</i> , <i>LPP2607</i> , <i>LPP0845</i> E <i>LPP0972</i>	51

Índice de gráficos

GRÁFICO 1 - EXPRESSÃO RELATIVA DE <i>LP</i> PARIS, EM FASE ESTACIONÁRIA PRECOCE, APÓS 24 H E 48 H DE INFECÇÃO EM <i>A. CASTELLANII</i> . RESULTADOS CALCULADOS COM BASE NA MÉDIA DE SEIS ENSAIOS, PARA O PRIMEIRO CICLO, E DE TRÊS PARA O SEGUNDO CICLO (NORMALIZAÇÃO – <i>GIRASE A</i> ; AMOSTRA CALIBRADORA (24 H) – GENE RESPECTIVO NO TEMPO 0 H; AMOSTRA CALIBRADORA (48 H) – GENE RESPECTIVO NO TEMPO 24 H).	41
GRÁFICO 2 - EXPRESSÃO RELATIVA DE <i>LP</i> PARIS, EM FASE ESTACIONÁRIA TARDIA, APÓS 24 H E 48 H DE INFECÇÃO EM <i>A. CASTELLANII</i> . RESULTADOS CALCULADOS COM BASE NA MÉDIA DE SEIS ENSAIOS, PARA O PRIMEIRO CICLO, E DE UM PARA O SEGUNDO CICLO (NORMALIZAÇÃO – <i>GIRASE A</i> ; AMOSTRA CALIBRADORA (24 H) – GENE RESPECTIVO NO TEMPO 0 H; AMOSTRA CALIBRADORA (48 H) – GENE RESPECTIVO NO TEMPO 24 H).....	44
GRÁFICO 3 - EXPRESSÃO RELATIVA DE <i>LP</i> PARIS, EM FASE ESTACIONÁRIA PRECOCE, APÓS 48 H DE INFECÇÃO EM <i>A. CASTELLANII</i> . RESULTADOS CALCULADOS COM BASE NA MÉDIA DE SEIS ENSAIOS. (NORMALIZAÇÃO – <i>GIRASE A</i> ; AMOSTRA CALIBRADORA – GENE RESPECTIVO NO TEMPO 0H).	47
GRÁFICO 4 - EXPRESSÃO RELATIVA DE <i>LP</i> PARIS, EM FASE ESTACIONÁRIA TARDIA, APÓS 48 H DE INFECÇÃO EM <i>A. CASTELLANII</i> . RESULTADOS CALCULADOS COM BASE NA MÉDIA DE SEIS ENSAIOS. (NORMALIZAÇÃO – <i>GIRASE A</i> ; AMOSTRA CALIBRADORA - GENE RESPECTIVO NO TEMPO 0 H).....	48

1. Introdução

1.1.Contextualização histórica

Julho de 1976, Filadélfia: decorria a quinquagésima oitava convenção da Legião Americana, no Hotel Bellevue Stratford, quando 182 dos 4000 delegados presentes contraíram uma pneumonia grave, dos quais, 146 foram hospitalizados e 29 acabaram por sucumbir. Após minuciosa investigação epidemiológica determinou-se que a transmissão da doença havia ocorrido por via aérea, eliminando-se assim a possibilidade de contágio directo, e que os casos se doença haviam concentrado num Hotel da convenção em particular (Fraser *et al.*, 1997; McDade *et al.*, 1977). Apesar do intenso e laborioso

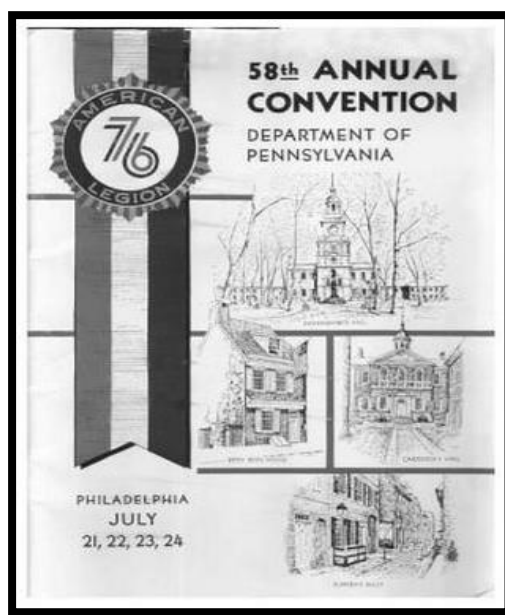


Figura 1 - Capa do programa da convenção no estado da Pensilvânia, em 1976

trabalho de investigação, a verdadeira causa deste surto passou despercebida durante meses. Este insucesso despoletou, embora temporariamente, um sentimento de descrédito sobre a capacidade científica dos investigadores do “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) de Atlanta, abalada também, na altura, pela dificuldade de identificação do agente de uma epidemia de gripe, que havia surgido no mesmo ano, e pelas consequências desastrosas do respectivo programa de vacinação (Washington, 1988; Dowdle, 1993). Foram necessários dez meses para que o agente responsável por este surto, que se veio a designar *Legionella pneumophila* (Lp), fosse, finalmente, isolado e identificado por Joseph McDade e Charles Shepard (McDade *et al.*, 1977).

No entanto, a verdadeira história da Doença dos Legionários (DL) não teve início em 1976, mas, provavelmente, 33 anos antes, em 1943. O primeiro isolamento de *Legionella* spp. foi realizado pelo Capitão Hugh Tatlock, médico militar, durante uma epidemia de etiologia desconhecida, em Fort Bragg, na Carolina do Norte (Daniels & Grennan, 1943). Após inoculação de vários cobaios com sangue de soldados doentes, Tatlock isolou o que pensou ser uma Rickettsia, a qual ficou conhecida como “estirpe de Tatlock” (Tatlock, 1944). Trinta e seis anos depois, em 1980, Hebert, Steigerwalt e Brenner identificam o agente como *Legionella micdadei*.

Alguns anos mais tarde, em 1949, durante os seus estudos sobre Rickettsioses, Marilyn Bozeman isola dois microrganismos desconhecidos até à data aos quais atribuiu as designações “OLDA” e “WIGA”, estirpes, actualmente, reconhecidas como *Legionella pneumophila* e *Legionella bozemanni*, respectivamente (McDade, Brenner, & Bozeman, 1979). Em 1959, a mesma investigadora isola, a partir de um paciente com pitíriase rósea, o agente “HEBA”, o qual veio a ser correctamente identificado, em 1979, como *Legionella micdadei* (Cordes, Wilkinson, Gorman, Fikes, & Fraser, 1979; Brenner *et al.*, 1980).

Surtos de doença respiratória aguda (DRA), datados de 1959, têm sido atribuídos a Lp. Em 1965, no hospital “St. Elizabeth”, em Washington, foi registado um surto de DRA, o qual, em resultado de investigações epidemiológicas, fez levantar a questão da disseminação do agente por via aérea (Terranova, Cohen, & Fraser, 1978; Thacker *et al.*, 1978; Osterholm *et al.*, 1983). O episódio de DRA mais memorável decorreu durante o ano de 1968, na cidade de Pontiac, pertencente ao estado norte-americano de Michigan. Este terá sido descrito como uma epidemia de infecção respiratória, sem comprometimento pneumónico, que se pensa ter sido resultado da exposição ao agente *Legionella* através do sistema de ar condicionado. A doença foi denominada por Febre de Pontiac, a qual, à semelhança da Doença dos Legionários, já teria sido responsável por surtos anteriores mas sem que se identificasse a verdadeira causa (Glick *et al.*, 1978; Armstrong *et al.*, 1985).

Desde então, as equipas de investigação desenvolveram meios de cultura artificiais (McDade *et al.*, 1977; Dumoff, 1979; Edelstein & Finegold, 1979; Feeley, *et al.*, 1979), descobriram o modo de disseminação da DL (Shands *et al.*, 1985) e compreenderam o papel das amibas na ecologia ambiental da *Legionella* spp., sem as quais a sua manutenção e multiplicação no ambiente não seriam possíveis (Morris, *et al.*, 1979; Rowbotham, 1980; Tobin, Swann, & Bartlett, 1981; Fields, Shotts, Feeley, Gorman, & Martin, 1984).

1.2.Epidemiologia

Desde 1976, ano do primeiro grande surto de pneumonia conhecido, que a consciência para a importância da DL tem vindo a aumentar entre a comunidade de profissionais de saúde. O melhor conhecimento da doença (apresentação clínica e factores de risco), do microrganismo (regulação génica, factores de virulência e ecologia) e das fontes de contágio ambiental, têm permitido uma abordagem mais precisa no controlo da disseminação deste microrganismo (Campese *et al.*, 2011).

Os microrganismos do género *Legionella* apresentam uma distribuição ubíqua, com preferência por locais aquáticos como lagos e rios, dada a presença de hospedeiros protozoários necessários à sua sobrevivência e multiplicação. A doença é normalmente associada a ambientes de origem antropogénica (ex.: reservatórios de água, torres de arrefecimento, tubagens de redes prediais, pontos de extremidade das redes pouco utilizadas, etc.) locais onde a água quente e a presença de biofilmes suportam o crescimento e a sobrevivência das espécies (Fields, Benson, & Besser, 2002).

A DL, definida como uma pneumonia severa, resulta da inalação de aerossóis contaminados por *Legionella* e apresenta-se como uma das principais causas de pneumonia contraídas na comunidade ou em ambiente hospitalar (Edelstein, 1998; Blasi, 2004). A maioria dos casos são considerados esporádicos, mas a frequência de casos associados ou surtos tem vindo a aumentar de forma considerável. A morbilidade e mortalidade são parâmetros difíceis de calcular, principalmente porque a maior parte das ocorrências, esporádicas ou epidémicas, não são correctamente diagnosticadas nem notificadas, impedindo assim a sua inclusão nas estatísticas de Saúde Pública (World Health Organization, 2007).

Na Europa, no final dos anos 90, segundo a Organização Mundial de Saúde, observou-se um aumento no número de países com registo de dados referentes a esta doença. A maior taxa de incidência, correspondente ao ano de 1999, foi reportada na Bélgica, 19,5/milhão de habitantes, seguida pela Dinamarca, 17,0/milhões e, finalmente, na Holanda com 16,8/milhões de habitantes. Nos Estados Unidos, entre 1990 e 2005, mais de 23.000 casos foram reportados ao CDC, sendo, a grande maioria, de carácter esporádico. No entanto, durante a década de 80, 11% dos casos foram associados a surtos, tanto de origem nosocomial como adquiridos na comunidade (World Health Organization, 2000).

Em Portugal, a doença foi descrita pela primeira vez em 1980 (Guerra, Pereira, Fernandes, Vargas, & Carneiro, 1981) e pertence à lista de Doenças de Declaração Obrigatória desde 1999 (Portaria nº 1071/98, de 31 de Dezembro) (DGS, 1998).

Em 1986, foi criado, pela comunidade europeia, o “European Working Group for Legionella Infections” (EWGLI), grupo que Portugal integra desde o início e no qual se congregaram as vertentes clínica e ambiental de prevenção da DL. Em 1987, o grupo EWGLI introduz a rede “European Surveillance Scheme for Travel-Associated Legionnaires’ Disease”, actualmente designada por “European Legionnaires’ Disease Surveillance Network” (ELDSNet) e desde 2010 coordenada pelo ECDC “European Center for Disease Prevention and Control” (ECDC, 2013).

1.3.Caracterização da família *Legionellaceae*

A família *Legionellaceae*, pertencente ao subgrupo monofilético da divisão gamma das Protobactérias, constituída, em exclusivo, pelo género *Legionella* (Fields *et al.*, 2002), compreende 58 espécies, pertencentes a mais de 70 serogrupos, e 3 subespécies (*Legionella pneumophila* subsp. *fraseri*, *Legionella pneumophila* subsp. *pascullei* e *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*). Das espécies actualmente descritas, aproximadamente um terço tem sido associado a doença em humanos (Park, Yun, Kim, Chun & Ahn, 2004). No entanto, entre 70% a 90% dos casos, devem-se a *Legionella pneumophila* (Lp) serogrupo (sg) 1, incluindo a recentemente caracterizada *Legionella pneumophila* str. Paris, estirpe altamente prevalente em França e responsável por 33% dos casos de Legionelose entre 1988 e 1997 em Paris (Lawrence *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002; Aurell, Etienne & Forey, 2003). De acordo com a caracterização genómica, conduzida por Cazalet e colaboradores, em 2004, esta estirpe possui um cromossoma circular com 3,545,687 pb, conteúdo G+C médio de 38% e um plasmídeo com 131,885 pb (Cazalet *et al.*, 2004).

Filogeneticamente, o parente mais próximo da família em estudo é a *Coxiella burnetti*, o agente etiológico da Febre Q. Este microrganismo partilha um estilo de vida intracelular semelhante aos microrganismos do género *Legionella*, podendo pressupor a utilização de genes comuns para o processo de infecção dos seus hospedeiros.

O género *Legionella* é constituído por bacilos de Gram negativos, pleomórficos, não esporulados, catalase positivos, com dimensões que oscilam entre os 0,3-0,9 µm de

diâmetro e os 2-20 µm de comprimento. São aeróbios estritos, embora o seu crescimento seja favorecido por uma atmosfera contendo entre 5 a 10% de CO₂.

A sua temperatura óptima de crescimento ronda os 35°C podendo variar entre os 25 - 42°C (Katz & Hammel, 1987). Normalmente, o tempo de incubação varia entre os 2-5 dias podendo estender-se até aos 10 dias em casos de estirpes atípicas ou em culturas primárias (Benson & Fields, 1998).

A maioria das espécies é móvel, com excepção de *L. oakridgensis*, devido à presença de um ou vários flagelos de localização polar ou subpolar, sendo que a sua expressão parece estar condicionada por factores ambientais, mais concretamente, a temperatura. Nutricionalmente, são extremamente exigentes e sobrevivem como parasitas intracelulares de amibas, protozoários ciliados e fungos filamentosos (Fields, 1996). Esta associação não mutualista permite explorar o hospedeiro como fonte de nutrientes, protecção e veículo de colonização (Steinert, Hentschel, & Hacker, 2002). Em 2004, Cazalet *et al.*, descrevem um importante benefício decorrente da associação *Legionella*/protozoário: a aquisição de factores de virulência, por fenómenos de transferência horizontal, que permitem codificar para proteínas funcionalmente semelhantes às do hospedeiro, as quais poderão ser responsáveis pela modulação do ciclo de vida intracelular nos humanos. Os microrganismos deste género podem ser encontrados em ambientes aquáticos, naturais ou de origem antropogénica, em amostras de solo (ex. *Legionella longbeachae*) ou associados a biofilmes (Steele, 1989; Fields, 1996; Kwaik, Gao, Stone, Venkataraman, & Harb, 1998).

1.4.Patogénese – O ciclo de vida intracelular

A presença de protozoários, em ambientes aquáticos ou terrestres, de origem natural ou antropogénica, é fundamental para o crescimento e amplificação das espécies do género *Legionella* (Rowbotham, 1980; Fields, 1996). Catorze espécies de amibas, destacando-se a *Hartmannellae* e a *Acanthamoebae* duas espécies de protozoários ciliados demonstraram suportar o crescimento intracelular de Lp (Fields, 1996; Hagele *et al.*, 2000). Estes organismos eucariotas, para além de providenciarem os nutrientes necessários ao desenvolvimento intracelular bacteriano, funcionam simultaneamente como protecção, quando as condições ambientais são menos favoráveis (ex.: decréscimo de temperatura ou exposição ao cloro) (Fields *et al.*, 2002; Ohno, Kato, Sakamoto, Kimura, & Yamaguchi, 2008). Estudos epidemiológicos e moleculares têm vindo a

evidenciar o papel das amibas como potenciais “incubadoras evolutivas” para a emergência da Lp como patógeno oportunista de macrófagos alveolares. Tal facto poderá dever-se à aquisição de genes eucarióticos, por co-evolução com amibas, e/ou à adaptação ao estilo de vida intracelular em hospedeiros eucariotas primitivos (Lurie-Weinberger *et al.*, 2010; Al-Quadani, Price, & Kwaik, 2012; Price & Kwaik, 2012).

A DL é iniciada pela inalação de *Legionella*. No entanto, apesar do carácter ubíquo, estes microrganismos raramente causam doença. Como factores predisponentes à ocorrência de uma infecção salienta-se: a presença de estirpes virulentas no ambiente, um meio de dispersão por aerossolização e condições ambientais propícias ao desenvolvimento e inalação de uma dose infectante de bactérias por um hospedeiro susceptível.

A Lp é o único exemplo documentado de um patógeno intracelular, capaz de invadir e replicar-se, tanto em macrófagos alveolares humanos como em diferentes espécies de amibas (Kwaik *et al.*, 1998). Contudo, ao contrário dos hospedeiros protozoários onde a disseminação ocorre sem restrições, a infecção em macrófagos alveolares é limitada (Fields, 1996).

As amibas são o hospedeiro natural da Lp e constituem o eixo central em torno do qual o ciclo de vida deste microrganismo se desenvolve (Garduño, Garduño, Hilltz, & Hoffman, 2002). Adicionalmente, desempenham um papel primordial na presença e amplificação da Lp no ambiente e na transmissão da DL (Fields *et al.*, 2002).

O ciclo de vida intracelular da Lp é constituído por duas grandes fases: a fase replicativa, que se caracteriza pela ausência de mobilidade e pela repressão das características transmissivas durante fase exponencial do crescimento bacteriano; e a fase transmissiva, a qual confere às bactérias sensibilidade ao sódio, citotoxicidade, resistência osmótica, mobilidade e capacidade de evasão do complexo fagossoma-lisossoma durante fase estacionária (Joshi & Swanson, 1999; Amer & Swanson, 2002; Bachman & Swanson, 2004; Molmeret, Bitar, Han, & Kwaik, 2004; Molofsky & Swanson, 2004).

Estudos conduzidos em 1980, por Horwitz e Silverstein, determinaram que a entrada da Lp nos macrófagos ocorre por fagocitose por enrolamento, processo, parcialmente mediado, por um sistema de três componentes composto pelos receptores de complemento CR3 e CR1. Após ingestão pelo fagócito, a Lp em fase estacionária, estabelece-se no interior do fagossoma, ou “*Legionella containing-vacuole*” (LCV), evitando o sequestro e consequente destruição no fagolisossoma. Cerca de 1 hora após a

formação do LCV, a face citoplasmática associa-se com as mitocôndrias do hospedeiro e 4 horas depois, o vacúolo encontra-se envolvido por retículo endoplasmático. Na protecção deste vacúolo, a Lp converte-se na sua forma replicativa, com características acido-tolerantes, e deixa de expressar vários factores de virulência. Como consequência, o fagossoma funde-se com o lisossoma e cria um novo nicho de replicação rico em nutrientes. Uma vez esgotado o fornecimento de aminoácidos, dá-se a acumulação de um segundo mensageiro, 3',5'-bispirofosfato (ppGpp), o qual coordena a entrada em fase estacionária, por aumento do factor σ (RpoS) e à expressão de características que promovem a transmissão (fase transmissiva) para um novo fagócito (Swanson & Hammer, 2000).

1.5.Factores de virulência

O estudo dos factores de virulência, numa tão vasta gama de hospedeiros, tem desencadeado alguma especulação sobre a evolução dos microrganismos patogénicos intracelulares. Actualmente, é reconhecido que o processo de co-evolução entre hospedeiros eucariotas e a Lp terá conduzido à selecção de factores de virulência necessários à exploração dos processos celulares do respectivo hospedeiro. Estas interacções operam como mecanismos de pressão selectiva para a aquisição de factores de virulência que facilitam a sobrevivência intracelular e, subsequentemente, a infecção (Fields, 1996; Kwaik *et al.*, 1998; Swanson & Hammer, 2000).

De forma a compreender a patogenicidade da Lp, um grande número de factores de virulência tem sido alvo de caracterização (Dowling, Saha, & Glew, 1992; Cianciotto, 2001). Os factores caracterizados incluem genes necessários para todo o processo de infecção, mais concretamente, a fixação à célula hospedeira, a sua sobrevivência, a replicação intracelular e a sua disseminação (Huang, *et al.*, 2006).

Os produtos de expressão génica envolvidos no processo de fixação e infecção intracelular incluem: os pili tipo IV; a proteína Hsp60, uma chaperona ou proteína de choque térmico de peso molecular 60 kDa; a proteína RtxA, uma proteína PFP (“pore-forming protein”), que facilita o tráfego molecular bacteriano durante o processo de infecção; o gene *mip* (“macrophage infectivity potentiator”) e a proteína MilA (“macrophage-specific infectivity”) (Cianciotto & Fields, 1992; Garduño, Garduño, & Hoffman, 1998; Harb & Abu Kwaik, 2000; Cirillo, Bermudez, El-Etr, Duhamel, & Cirillo, 2001; Samrakandi, Cirillo, Ridenour, Bermudez, & Cirillo, 2002).

Os genes envolvidos nos mecanismos de sobrevivência e replicação intracelular encontram-se abrangidos num *loci* cromossómico, contendo 24 genes, designado por Dot/Icm (“defect in organelle trafficking”/“intracelular multiplication”). Funcionalmente, postula-se que este sistema de secreção tipo IV seja o principal responsável pela fuga temporária do fagossoma à via endocítica (Segal & Shuman, 1998).

Os genes que codificam para o sistema de secreção tipo II são necessários para o crescimento intracelular e para a promoção da virulência no modelo animal, onde o sistema seja dependente de prepilina peptidase (*pilD*). A análise de mutantes, defectivos para a formação de pili tipo IV, permitiu a descoberta dos genes envolvidos no funcionamento do mesmo. Deste, apenas os genes *pilE* (proteína pilina) e *pilD* têm sido estudados em maior detalhe. Em termos funcionais, o gene *pilE* não aparenta ser necessário para o crescimento intracelular, mas poderá estar envolvido no processo de fixação à célula hospedeira. O gene *pilD*, que codifica para a enzima prepilina peptidase, é essencial tanto para a produção de *pili* como de proteínas pertencentes ao sistema de secreção tipo II (Rossier & Cianciotto, 2001).

Vários outros *loci* envolvidos no crescimento intracelular de Lp também têm vindo a ser identificados, tais como: o gene *mak* (“macrophage killing”), o gene *mil* (“macrophage-specific infectivity”) e o gene *pmi* (“protozoan macrophage infectivity”). Mutações em qualquer um destes *loci* poderão resultar num acentuado decréscimo da multiplicação intracelular ou na sua total abolição. No entanto, o mecanismo de acção por detrás destes genes ainda permanece desconhecido (Miyake *et al.*, 2005).

A Lp possui uma multiplicidade de sistemas de aquisição de ferro, os quais desempenham um papel de extrema importância no processo de infecção intracelular. Os factores envolvidos na aquisição deste metal incluem a utilização de hemina; o locus *iraAB*, que se pensa codificar para um transportador de péptidos; os genes de maturação do citocromo C (*ccm*); o gene *frgA*, cujo produto de expressão possui homologia com a enzima aerobactina sintetase; a legiobactina, o primeiro exemplo de um sideróforo pertencente ao género *Legionellae* e duas ferrinas redutases. Outros potenciais factores de virulência incluem citotoxinas, fosfolipases (fosfolipase C), lipopolissacárideos (LPS) e metaloproteínas de zinco (Dowling *et al.*, 1992).

1.6. Manifestações clínicas

Actualmente, o termo genérico Legionellose é utilizado para descrever infecções provocadas por microrganismos do género *Legionella*. Estas podem manifestar-se através de um espectro clínico muito variável que pode ir desde formas assintomáticas, detectadas apenas por seroconversão, a síndromes gripais (Febre de Pontiac) até a pneumonias potencialmente fatais (DL).

A DL é uma infecção que se caracteriza como uma pneumonia de início súbito, clinicamente indistinguível de pneumonias de diferente etiologia, nomeadamente de origem pneumocócica, dada a semelhança de sinais, sintomas e padrões radiográficos (Edelstein, 1993; Fields *et al.*, 2002; Diederer, 2008).

Esta doença afecta principalmente pessoas idosas ou com idade superior a 50 anos, doentes com comprometimento respiratório e cardíaco, fumadores, diabéticos, pacientes imunocomprometidos e transplantados de órgãos sólidos (Broome & Fraser, 1979; Marston, Lipman, & Breiman, 1994).

O tempo de incubação varia entre os 2 e os 10 dias podendo prolongar-se, em situações excepcionais, até às 3 semanas. Apesar da ausência de uma síndrome característica, vários sinais clínicos têm vindo a ser associados à DL, tais como: febre alta, cefaleias, mialgias, dispneia e tosse não produtiva ou com expectoração não purulenta. São também frequentes manifestações de ordem sistémica, tais como, diarreia, confusão mental e alterações da função hepática, hiponatrémia e hipofosfatémia (Den Boer & Yzerman, 2004).

A taxa de mortalidade é variável podendo oscilar entre 1% e 80%, dependendo do estado de saúde do paciente, da rapidez de administração de terapia adequada e da origem da infecção (comunidade ou nosocomial) (Benin, Benson, & Besser, 2002). Actualmente, as directrizes de tratamento para a DL aconselham a administração de macrólidos (azitromicina ou claritromicina) e/ou fluoroquinolonas (levofloxacina) (Marques, 1999).

A Febre de Pontiac caracteriza-se como uma síndrome gripal auto-limitada, descrita apenas em situações epidémicas, com uma taxa de contágio elevada, mas sem qualquer registo de morte provocada pela mesma.

O período de incubação é relativamente curto, entre 24 e 48 horas, período a partir do qual os pacientes se apresentam com febre, arrepios, tosse seca, dores musculares, mal-estar generalizado e dores de cabeça.

O tratamento é sintomático e o diagnóstico é sugerido pelo aparecimento de uma síndrome aguda, em vários indivíduos, num curto espaço de tempo, após exposição a uma fonte de aerossóis.

A Legionelose Extrapulmonar (LE) é rara, mas as manifestações clínicas são geralmente dramáticas, especialmente em pacientes severamente imunocomprometidos (Edelstein, 2006).

A Lp tem vindo a ser implicada em casos de sinusite, celulite, pancreatite, peritonite e pielonefrite sendo a sua disseminação associada a bacteriemias. Este facto tem vindo a ser comprovado não só através de achados anatomopatológicos, mas também pelo isolamento do agente a partir de vários órgãos (Lowry & Tompkins, 1993).

O local de infecção extrapulmonar mais frequente é o coração, havendo várias descrições associadas a casos a miocardites, pericardites e endocardites em pacientes com próteses valvulares (McCabe, Baldwin, McGregor, Miller, & Vosti, 1984; Tompkins, Roessler, Redd, Markowitz, & Cohen, 1988; Chen, Schapiro & Loutit, 1996).

1.7.Diagnóstico Laboratorial

Actualmente existem cinco técnicas disponíveis para o diagnóstico laboratorial da DL, sendo estas: i) o exame cultural de secreções do tracto respiratório inferior; ii) a pesquisa de antigénios solúveis na urina; iii) a imunofluorescência directa (ex.: secreções brônquicas, biópsias pulmonares); iv) a imunofluorescência indirecta a partir de amostras de soro; v) e a pesquisa de ácido nucleico.

1.7.1. Exame cultural

O isolamento de *Legionella* spp permanece como metodologia “gold standard” sendo considerada como a técnica com maior especificidade para o diagnóstico da DL (Edelstein, 1987; Fields *et al.*, 2002). A sensibilidade é próxima de 60% e a especificidade de 100% (Edelstein, 1987; Maiwald, Helbig & Luck, 1998).

O diagnóstico através desta metodologia requer a utilização de um meio de cultura específico, conhecimentos técnicos especializados e um adequado processamento das amostras. No entanto, esta técnica é extremamente robusta permitindo a detecção de um número considerável de espécies de *Legionella*, independentemente do serotipo. Como principal desvantagem, destaca-se o tempo de incubação necessário até à obtenção de um resultado positivo, o qual poderá variar entre 7 e 10 dias, para espécies não *Legionella*

pneumophila. Para além do tempo de incubação prolongado, algumas espécies poderão ainda exibir um crescimento macroscópico atípico ou não se desenvolverem nos meios de cultura convencionais, implicando que o seu isolamento e manutenção sejam feitos através de processos de co-cultura com o protozoário hospedeiro (Den Boer & Yzerman, 2004).

O meio de cultura recomendado para a cultura de microrganismos do género *Legionella* é o agar “Buffered Charcoal Yeast Extract” (BCYE) suplementado com α -cetoglutarato, L-cisteína e pirofosfato de ferro (Feeley *et al.*, 1979; Edelstein, 1987; Morrill, Barbaree, Fields, Sanden, & Martin, 1990). As amostras de proveniência clínica e ambiental requerem, ainda, a adição de antibióticos e/ou antimicóticos de forma a reduzir a presença de uma eventual flora contaminante. No entanto, a presença de determinadas classes de antibióticos pode impedir o crescimento de algumas espécies de *Legionella*, como é exemplo o cefamandole, uma cefalosporina de segunda geração com actividade inibitória sobre estirpes não produtoras de β – Lactamases (ex.: *Legionella micdadei* e *Legionella bozemanii*) (Wadowsky & Yee, 1981; Edelstein, 1982; Lee, Vickers, Yu, & Wagener, 1993). Como tal, todas as amostras deverão ser inoculadas, simultaneamente, em meio de cultura com e sem adição de inibidores.

O isolamento de *Legionella* pode ser efectuado a partir de várias amostras biológicas, destacando-se, como exemplos de eleição, as lavagens bronco-alveolares, os aspirados brônquicos, as biópsias pulmonares e a expectoração.

No que respeita às amostras de expectoração, a particularidade passa pelo tratamento de cariz térmico ou acídico previamente à sementeira. Este tratamento poderá reduzir substancialmente o número de microrganismos viáveis (Buesching, Brust, & Ayers, 1983; Rowbotham, 1998).

Estima-se que a sensibilidade da metodologia possa variar entre 20 e 80%, resultados explicados pela natureza das amostras, pela administração de antimicrobianos previamente à colheita das mesmas e pelos conhecimentos técnicos de cada laboratório (Roig, Domingo, & Morera, 1994; Sopena *et al.*, 1998). Na prática os melhores resultados são obtidos em laboratórios com especial interesse em infecções por *Legionella*, com sensibilidades reportadas acima de 50% (Zuravleff, Yu, Shonnard, Davis, & Rihs, 1983).

1.7.2. Pesquisa directa de antígeno na urina

A detecção do antígeno solúvel na urina é uma técnica antiga, datada de 1979, que veio revolucionar o diagnóstico laboratorial da DL (Berdal, Farshy, & Feeley, 1979; Tilton, 1979). Actualmente é o teste laboratorial mais requisitado funcionando não só como método de diagnóstico em contexto clínico, mas também como ferramenta epidemiológica (Wever, Yzerman, Kuijper, Speelman, & Dankert, 2000).

A facilidade de obtenção de amostras e a celeridade de resposta, a qual, ao contrário do exame cultural, pode levar entre 15 minutos a 3 h, são as principais vantagens da utilização desta metodologia. Contudo, no que respeita à fiabilidade de identificação de outras espécies, que não *Lp* sg. 1, este método de diagnóstico não é ainda uma alternativa (Stout, Brennen, & Muder, 2000). Apesar da maioria das infecções estarem associadas a esta espécie e serogrupo, a total dependência neste método de diagnóstico poderá conduzir à omissão de 40% dos casos de Legionelose (Rigby *et al.*, 1997).

A excreção do antígeno é relativamente precoce, sendo detectado entre o 1º e o 3º dia ou entre o 8º e o 14º dia, em 88% e 100% dos casos, respectivamente. Contudo, a sua detecção pode prolongar-se, em casos esporádicos, por mais de 300 dias mesmo após resolução clínica. Este facto poderá fazer com que não seja possível estabelecer uma relação entre a excreção do antígeno e a infecção clínica, principalmente em pacientes com pneumonias recorrentes (Kohler, 1984).

No que respeita à natureza detalhada dos antígenos parciais excretados na urina, sabe-se apenas que os lipopolissacarídeos são o componente maioritário e que apresentam, como principais características, estabilidade térmica, resistência à lise enzimática e peso molecular próximo dos 10 kDa (Kohler *et al.*, 1981; Birtles, Harrison, Samuel, & Taylor, 1990).

Actualmente, a detecção destes componentes pode ser realizada com recurso a três técnicas: ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), RIA (Imunoradioensaio) ou ICT (Imunocromatografia) as quais apresentam percentagens de sensibilidade (75%-90%) e especificidade (100%) relativamente semelhantes. Em 1998, Domínguez *et al.* demonstraram que o processo de concentração do antígeno aumenta a sensibilidade da técnica sem redução da especificidade.

1.7.3. Pesquisa de antígeno por Imunofluorescência Directa, em amostras respiratórias

A pesquisa por imunofluorescência directa é um dos métodos de diagnóstico vulgarmente utilizado na detecção e identificação presuntiva de *Legionella* a partir de amostras de expectoração, secreções brônquicas, lavados bronco-alveolares e biopsias pulmonares (Grimont, 1986; Nguyen, Stout, & Yu, 1991). No contexto histórico, encontra-se reportado como o primeiro método capaz de detectar Lp a partir de amostras de tecido pulmonar (Cherry *et al.*, 1978). Como principais vantagens salienta-se o tempo reduzido de resposta (2 a 4 horas), característica particularmente útil em situações de surto, e a possibilidade de utilização da técnica mesmo após início de terapia antimicrobiana (Munro, Neville, Daley, & Mercer, 1994).

A sensibilidade da técnica é variável (25% e 75%) apresentado valores pouco consistentes, quando em comparação com o exame cultural, particularmente em infecções por espécies que não Lp (Zuravleff *et al.*, 1983; Edelstein, 1987). O tipo de amostra, o equipamento e a experiência dos técnicos de análise são outros factores que contribuem para a variação da sensibilidade (Edelstein, 1993). Relativamente à especificidade, foram reportadas percentagens acima dos 95%, valores que poderão ser igualmente afectados pela inexperiência do laboratório de análise ou por eventuais resultados falsos positivos decorrentes de reacções cruzadas com outros microrganismos (ex.: *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.* e *Flavobacterium spp.*). Em 1984, Gosting, Cabrian, Sturge e Goldstein, desenvolveram um anticorpo específico para Lp, serogrupos 1 a 8, para diagnóstico a partir de amostras clínicas, contornando assim o problema de especificidade associado à utilização de anticorpos policlonais.

Em suma, a fraca sensibilidade da técnica e os problemas de inespecificidade têm conduzido ao seu desuso, sendo sempre necessária a confirmação de um resultado positivo por outra técnica mais específica (ex.: exame cultural) (Murdoch, 2003).

1.7.4. Diagnóstico serológico

À semelhança da pesquisa directa de antígeno na urina, o diagnóstico serológico por imunofluorescência indirecta (IFI), foi determinante na detecção de anticorpos de *Legionella* a partir da análise do soro sanguíneo de vítimas do surto de Filadélfia (McDade *et al.*, 1977). As técnicas de ELISA, de microaglutinação, de contraimuno-electroforese e de hemaglutinação indirecta são outros exemplos de

metodologias utilizadas na detecção de anticorpos anti Lp (Farshy, Cruce, Klein, Wilkinson, & Feeley, 1979; Harrison & Taylor, 1988; Ruckdeschel & Ehret, 1993). Contudo, dos vários métodos de detecção disponíveis, apenas a técnica de IFI é considerada como teste de referência (Murdoch, 2003).

A determinação do título de anticorpos é realizada a partir de amostras de sangue colhidas com um intervalo de pelo menos 10 dias (correspondentes à fase aguda e convalescente). O diagnóstico confirmado é feito sempre que se observe seroconversão, ou seja, uma subida de quatro vezes do título de anticorpos, com um segundo título ≥ 128 para Lp sg. 1. Para outros serogrupos da Lp e para as outras espécies o diagnóstico será sempre presuntivo no caso de seroconversão (2º título ≥ 128). Apesar da seroconversão para Lp sg. 1 ser geralmente interpretada como preditiva de doença, a sensibilidade e especificidade para outras espécies e serogrupos é, ainda, uma das grandes limitações da técnica (Wilkinson *et al.*, 1983). Anticorpos de fase aguda com um título ≥ 256 , na presença de pneumonia, foram outrora considerados suficientes para o estabelecimento de um diagnóstico presuntivo. Esta observação tem-se demonstrado de fraca fiabilidade dada a alta prevalência de positividade de anticorpos de *Legionella* em pacientes sem evidência clínica de Legionelose (Plouffe *et al.*, 1995).

A sensibilidade da serologia é geralmente limitada, não só pelo tempo necessário até que se observe uma resposta imunitária detectável, mas também pela proporção de pacientes infectados que respondem imunologicamente. Aproximadamente 20% a 30% dos pacientes nunca desenvolvem títulos de anticorpos significativamente elevados, mesmo após observação prolongada, facto que limita a sensibilidade da técnica entre os 70% e os 80% para Lp sg. 1 (Harrison & Taylor, 1988; Edelstein, 1993).

A seroconversão decorre, em média, entre a terceira e quarta semana, após início da sintomatologia, em aproximadamente 70%-80% dos casos com exame cultural positivo para Lp sg. 1. A especificidade da seroconversão para Lp sg. 1 é de 99%, percentagem ligeiramente afectada por relatos de reacções cruzadas com espécies de *Campylobacter* e *Pseudomonas* (Boswell, Marshall, & Kudesia, 1996; Harrison, 1997).

O diagnóstico serológico para infecções por *Legionella* é uma ferramenta valiosa no contexto epidemiológico, mas de fraca utilidade no contexto clínico. O prolongado intervalos de tempo até obtenção de um resultado, a necessidade de testar soros emparelhados (colhidos com um intervalo de pelo menos 10 dias), a dificuldade de obtenção de amostras convalescentes e a impossibilidade de estabelecer um diagnóstico

para outras espécies que não *Lp* sg. 1, resultam numa metodologia com fraco impacto na decisão clínica (Stout & Yu, 1997; Murdoch, 2003).

1.7.5. Pesquisa de ácidos nucleicos

Um dos primeiros métodos para a detecção de ácidos nucleicos de *Legionella* data de 1984, ano em que Kohne, Speicherwald e Brenner desenharam uma sonda de ADN, com ligação ao ARN ribossomal, específica para os membros da família *Legionellaceae*. Contudo, a baixa especificidade do método, comprovada pelo aparecimento de falsos positivos, conduziu à sua posterior remoção do mercado (Fields *et al.*, 2002).

A técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR) representa um dos poucos métodos com potencial para detectar todas as espécies de *Legionellae* discriminar qual a espécie infectante. Actualmente, é activamente utilizada na detecção de ADN de *Legionella* a partir de amostras ambientais, podendo, no entanto, ser igualmente aplicada na análise de amostras clínicas, especialmente do tracto respiratório inferior. A maioria dos ensaios de PCR amplifica para regiões aleatórias do ADN (ex.: 5S ARNr, 16S ARNr ou a região intergénica 23S-5S) ou fragmentos do gene *mip* (MacDonell & Colwell, 1987; Engleberg, Carter, Weber, Cianciotto, & Eisenstein, 1989; Starnbach, Falkow, & Tompkins, 1989; Mahbubani *et al.*, 1990; Lisby & Dessau, 1994; Jonas, Rosenbaum, Weyrich, & Bhakdi, 1995; Miyamoto *et al.*, 1997).

Em termos percentuais, a PCR é uma técnica de sensibilidade moderada (85%) e elevada especificidade (99%), com capacidade para detecção do agente a partir de amostras de diferentes proveniências, tais como: lavagens bronco-alveolares, zaragatoas faríngeas e nasofaríngeas, células mononucleares do sangue periférico, urina e soro. A possibilidade de diagnóstico a partir de amostras de origem não respiratória é especialmente atractiva, principalmente em pacientes sem tosse produtiva (Murdoch *et al.*, 1996; Diederer, de Jong, Kluytmans, van der Zee, & Peeters, 2006).

A técnica de PCR em tempo-real (RT-PCR) trouxe vários benefícios ao diagnóstico de rotina, permitindo uma identificação mais fiável dos produtos amplificados e um aumento da rapidez de detecção do microrganismo infectante. Para além disso, este método reduz os riscos de contaminação cruzada, o tempo de processamento das amostras e elimina o passo de análise pós amplificação (Ballard *et al.*, 2000; Hayden *et al.*, 2001). Outras técnicas de RT-PCR que amplifiquem ARN em vez de ADN, como é exemplo a técnica de NASBA (“Nucleic Acid Sequence-Based Amplification”), poderão

apresentar percentagens de sensibilidade mais elevadas. O elevado número de cópias de ARN e o facto de a sua detecção implicar actividade biológica evita a detecção de microrganismos mortos ou não viáveis (Loens *et al.*, 2006).

Como principais desvantagens da PCR, enumera-se a indisponibilidade de dados que validem a sensibilidade e especificidade da técnica, quando em comparação com outros métodos de diagnóstico, a necessidade de standardização do método e a redução do efeito dos inibidores da reacção (Ursi, Ursi, Ieven, & Pattyn, 1992; Hu, Horn, Limaye, Gautom, & Fritsche, 2002; Lück, Helbig & Schuppler, 2002).

1.8. Estudo da expressão génica

A identificação dos genes transcritos e dos respectivos níveis de expressão, cuja análise pode ser realizada através de diferentes técnicas, são dois pontos importantes para a compreensão de um sistema biológico. Metodologias tradicionais de quantificação e detecção de ARN mensageiro (ARNm), como “Northern blot”, “Ribonuclease Protection Assay” ou “slot blot”, são alguns exemplos de técnicas desenhadas com este mesmo propósito. No entanto, são reconhecidamente laboriosas e, geralmente, de baixo rendimento e sensibilidade. Porém, recentes avanços ao nível da biologia molecular e da bioinstrumentação têm conduzido ao desenvolvimento de novas técnicas (ex.: “Serial Analysis of Gene Expression” – SAGE, “Amplified restriction Fragment-Length Polymorphism” – AFLP e RT-PCR) com uma vasta gama de sensibilidades e capacidades quantitativas.

1.8.1. Técnicas de PCR em tempo real

O advento da PCR e o uso da transcrição reversa associada à RT-PCR vieram modificar, drasticamente, a forma como se avalia o estudo da expressão génica. Actualmente, a RT-PCR é tida como o método de detecção e quantificação mais sensível para a análise dos níveis de expressão génica, particularmente em amostras pouco abundantes em ARNm (ex.: medula óssea, tecidos adiposos), em tecidos de pequenas dimensões (ex.: biópsias ou células únicas) ou quando se procura evidenciar pequenas alterações nos níveis de expressão.

A RT-PCR é uma técnica que permite monitorizar a reacção de amplificação em tempo real e quantificar, de forma relativa ou absoluta, o número de cópias presentes numa amostra. As reacções são caracterizadas, ao contrário da PCR convencional, pelo

ponto no tempo, durante o ciclo, em que a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, ao invés da quantidade de alvo acumulado no final da reacção. Este processo tornou-se possível através da utilização de corantes intercalantes (ex.: SYBR[®] green) ou de sondas marcadas com corantes fluorescentes (ex.: Taqman[®]) (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993, Valasek & Repa, 2005).

O SYBR[®] green liga-se ao ADN de cadeia dupla via intercalação entre pares de bases adjacentes. Uma vez intercalado, é emitido um sinal fluorescente seguido de uma excitação de luz. À medida que o número de produtos de amplificação acumula, após cada novo ciclo, é observado um aumento correspondente na fluorescência. No entanto, esta técnica requer um desenho cuidadoso e altamente específico dos oligonucleotídeos iniciadores, uma vez que o SYBR[®] green se liga a todo o ADN de cadeia dupla. Este simples facto poderá contribuir para o aumento do sinal de fluorescência e, consequentemente, numa sobrestimação do alvo em estudo (Cindy & Osborn, 2008).

As sondas Taqman[®] encontram-se marcadas por um fluóforo (“reporter”) e uma molécula supressora (“quencher”), covalentemente ligados à sonda de oligonucleotídeos nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O “reporter” é a molécula que emite fluorescência e o “quencher” a que impede a emissão da mesma (Livak, Flood, Marmaro, Giusti, & Deetz, 1995). Assim sendo, durante o ciclo de extensão, a actividade exonuclease 5' da *Taq* polimerase cliva o fluóforo da sonda e um sinal de fluorescência é detectado. A amplificação da sequência-alvo é assim medida pela libertação e acumulação do fluoróforo durante a fase de extensão de cada ciclo de PCR. A especificidade adicional, proporcionada pela presença da sonda, garante que o sinal fluorescente, gerado durante a reacção, é derivado apenas da amplificação da sequência em estudo (Smith, Nedwell, Dong, & Osborn, 2007).

As vantagens da utilização do RT-PCR para fins de quantificação, face a outras metodologias, são inúmeras. Para além da produção de dados quantitativos com uma gama de precisão elevada, esta técnica não requer manipulação pós-amplificação, apresenta valores de sensibilidade extremamente elevados (1000 vezes superior à técnica de hibridação por “dot blot”) e permite detectar, de forma fiável, pequenas diferenças de expressão entre amostras (Morrison, Weis, & Wittwer, 1998; Gentle, Anastasopoulos, & McBrien, 2001; Malinen, Kassinen, Rinttilä, & Palva, 2003). A RT-PCR apresenta, ainda, capacidade de discriminação entre ARN mensageiros, requer menor quantidade de ARN para detecção dos genes de interesse e gera uma quantidade massiva de dados (ex.: microarrays) (Wong & Medrano, 2005). Como principal desvantagem, salienta-se o custo

do equipamento e dos reagentes. Para além disso, dada a elevada sensibilidade da técnica, torna-se imperativo um correcto delineamento experimental e um profundo conhecimento sobre técnicas de normalização para que as conclusões sejam correctamente extrapoladas.

A estratégia de quantificação pode ser efectuada por quantificação absoluta (QA) ou relativa (QR) (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Yuan, Reed, Chen, & Stewart, 2006). Um dos métodos mais frequentes de QA é baseado na elaboração de uma curva padrão a partir de amostras de concentração conhecida. Logo, a concentração de uma amostra desconhecida pode ser determinada por simples interpolação do sinal de PCR face à respectiva curva padrão. No entanto, este método apresenta uma limitação importante, uma vez que assume igual eficiência de amplificação tanto para as amostras como para a amostra padrão. Facto que aumenta a possibilidade de introdução de erros de quantificação (Brankatschk, Bodenhausen, Zeyer, & Bürgmann, 2012).

Actualmente, PCR digital apresenta-se como uma nova abordagem para a detecção e QA de ácidos nucleicos, uma vez que permite a contagem directa do número de moléculas alvo, em vez de se basear em padrões de referência ou controlos endógenos (White, Blainey, Fan, & Quake, 2009).

A QR, pelo método $\Delta\Delta C_t$, é o método mais utilizado na análise de expressão génica. Este método permite determinar o *ratio* de expressão de um gene alvo, em comparação com um controlo/calibrador, normalizado pelo *ratio* de expressão do gene de referência. Ao utilizar um calibrador, os resultados são expressos como uma proporção alvo / referência (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl, 2004; Valasek & Repa, 2005; Yuan *et al.*, 2006). Esta abordagem é extremamente útil em estudos que procurem demonstrar diferenças e/ou tendências fisiológicas no padrão de expressão. Actualmente, são vários os modelos matemáticos disponíveis para o cálculo da expressão de genes a partir de ensaios normalizados de QR (Tabela 1). Contudo, dever-se-á ter em conta que a interpretação dos resultados se encontra directamente dependente do gene de referência e do processo de normalização utilizado (Liu & Saint, 2002; Muller, Janovjak, Miserez, & Dobbie, 2002).

Uma das grandes limitações desta estratégia de quantificação é a necessidade de inclusão de um controlo por cada novo ensaio, uma vez que os dados utilizados para comparação são apenas aplicáveis a amostras presentes na mesma sessão de PCR. Este facto implica que nos casos em que seja necessário um exercício de comparação de dados, a partir de ensaios realizados em dias diferentes, a QA poderá ser uma alternativa viável (Peirson, Butler, & Foster, 2003).

Table 1. Characteristics of Relative Quantitation Methods				
Methods (Reference)	Amplification Efficiency Correction	Amplification Efficiency Calculation	Amplification Efficiency Assumptions	Automated Excel-Based Program
Standard Curve (31)	no	standard curve	no experimental sample variation	no
Comparative $C_t (2^{-\Delta\Delta C_t})$ (21)	yes	standard curve	reference = target	no
Pfaffl et al. (26)	yes	standard curve	sample = control	REST ^a
Q-Gene (23)	yes	standard curve	sample = control	Q-Gene ^b
Gentle et al. (7)	yes	raw data	researcher defines log-linear phase	no
Liu and Saint (22)	yes	raw data	reference and target genes can have different efficiencies	no
DART-PCR (30)	yes	raw data	statistically defined log-linear phase	DART-PCR ^c

^a C_t , cycle threshold, DART-PCR, data analysis for real-time PCR; REST, relative expression software tool.
^bwww.gene-quantification.info
^cwww.BioTechniques.com
^dnar.oupjournals.org/cgi/content/full/31/14/e73/DC1

Figura 2- Caracterização dos métodos de quantificação disponíveis para o cálculo da expressão génica. (Wong & Medrano, 2005).

1.9.Contextualização do estudo proposto

A Lp é um agente patogénico com capacidade para infectar diferentes espécies de protozoários e metazoários, característica que tem vindo a influenciar a estrutura genómica deste microrganismo através do processo de transferência horizontal de genes. Este facto, por si só, é suficiente para justificar a presença de genes, no genoma da Lp, que codificam para proteínas eucariotas com funções e estruturas do organismo hospedeiro (Gomez-Valero, Rusniok, Cazalet, & Buchrieser, 2011; Al-Quadani, *et al.*, 2012). Especula-se que determinados protozoários, nomeadamente a ameba, poderão ter actuado como “melting pot”, permitindo a evolução de diversos microrganismos por mecanismos de aquisição e perda de genes, fenómeno que poderá ter conduzido ao estilo de vida parasítico em amebas ou à emergência de novos microrganismos patogénicos, como é o exemplo da Lp (Price & Kwaik, 2012). Todos estes argumentos são fortemente corroborados pelas semelhanças entre o ciclo de vida da Lp, em amebas e em macrófagos alveolares humanos (Al-Quadani, *et al.*, 2012).

A replicação da Lp dentro de amebas de vida livre, em comparação com amebas cultivadas *in vitro*, demonstra um aumento da resistência a condições adversas, nomeadamente: resistência a biocidas e antibióticos, potencial de virulência melhorado,

perfis bioquímicos e proteicos alterados e motilidade (Cirillo, Falkow, & Tompkins, 1994; Abu, *et al.*, 1998; Molmeret *et al.*, 2005).

Central para a patogénese da Lp parecem ser os seus sistemas de secreção tipo II, IV, os pili tipo IV, a proteína de superfície *mip*, flagelos e tantos outros factores ainda sobre investigação (Swanson & Hammer, 2000; Garduño, Chong, Nasrallah, & Allan, 2011).

Juntamente com métodos mais tradicionais tais como, a bioquímica, a microbiologia e a biologia, o advento da genética molecular tem oferecido um meio robusto e uma visão crítica sobre a análise genética da patogénese da *Legionella* e na identificação e compreensão dos factores bacterianos envolvidos na patogénese na DL (Cianciotto, Eisenstein, Engleberg, & Shuman, 1989).

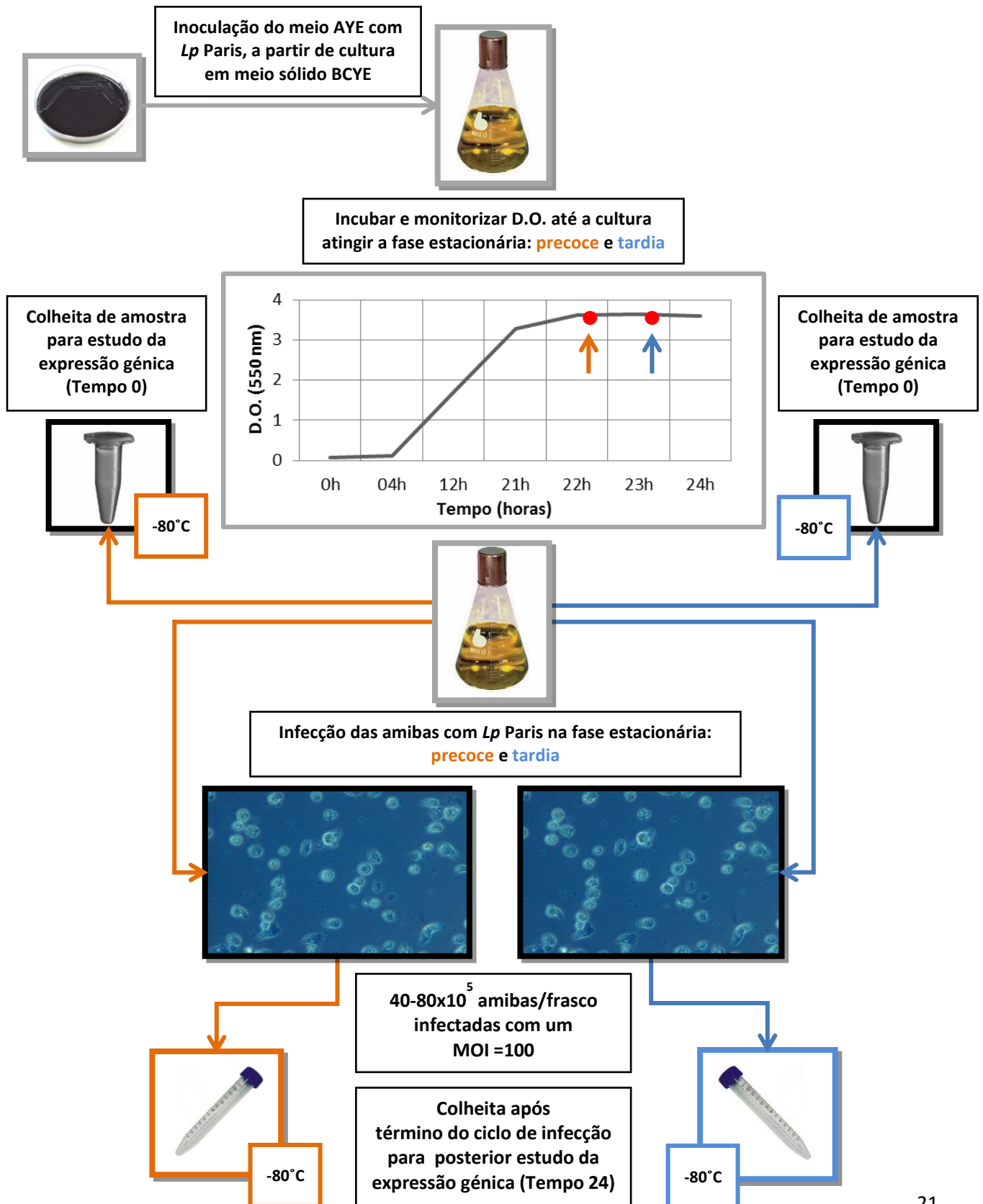
Como tal, o presente projecto de investigação teve como principais objectivos:

- a. Quantificar diferenças nos níveis de expressão génica da *Legionella pneumophila* str. Paris após infecção em *Acanthamoeba castellanii* com culturas em fase estacionária precoce e tardia;
- b. Determinar qual o efeito de consecutivos ciclos de infecção no padrão de expressão dos genes em análise;
- c. Compreender a dinâmica de multiplicação da *Legionella pneumophila*, através da quantificação do número de microrganismos viáveis, em diferentes pontos críticos do ciclo de infecção, durante um período máximo de dois ciclos infecciosos;
- d. Determinar eventuais alterações do padrão de sensibilidade ao sódio e de resistência ao choque osmótico das culturas de Lp durante um período máximo de dois ciclos infecciosos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Fluxograma – Protocolo de infecção (Ciclo de 24 horas)

O protocolo de infecção tentou recriar o processo natural de infecção da Lp em Ac durante 24 horas, tempo correspondente a um ciclo infeccioso.



2.2. Estirpes

Para a realização dos ensaios de infecção utilizou-se como estirpe infectante a *Legionella pneumophila* str. Paris. e como estirpe hospedeira a ameba *Acanthamoeba castellanii* (ATCC30010). Para os protocolos de infecção, só se utilizaram culturas de Lp com duas passagens prévias em meio de cultura sólido. A manutenção da cultura de *Acanthamoeba castellanii* foi efectuada de acordo com o protocolo em anexo (Anexo III).

2.3. Infecção – Ciclo de 24 horas

2.3.1. Preparação do inóculo para infecção em *Acanthamoeba castellanii*

A estirpe de *Legionella pneumophila* em estudo foi inoculada em agar BCYE- α (Oxoid) (Anexo II), sendo posteriormente incubada a 37°C durante 48 h. Após período de incubação e confirmação da pureza da cultura, procedeu-se à inoculação da estirpe em 100 ml de AYE (Anexo II). A cultura foi posteriormente incubada sob agitação (37°C, 170 rpm). Dezoito horas após a inoculação procedeu-se à leitura da densidade óptica (550 nm) até que a mesma atingisse dois pontos específicos da curva de crescimento:

- a) Fase estacionária **precoce**: A cultura continua a crescer mas a diferença entre as D.O. de duas leituras sucessivas é $\leq 0,50$.
- b) Fase estacionária **tardia**: A cultura parou de crescer e a diferença entre as D.O. de duas leituras sucessivas é $\geq 0,50$.

Para cada ponto de colheita (**a** e **b**), recolheram-se e centrifugaram-se 5 ml de cultura líquida para um tubo de 15 ml estéril (4000 rpm, 15 minutos, T.A.). Seguidamente, decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com volume de Meio de Infecção (MI) (Anexo II) suficiente para que a densidade óptica (D.O. 550 nm) da suspensão fosse aproximadamente igual a 1.2 ($\approx 1 \times 10^9$ UFC/ml).

Nota: A inoculação do meio de AYE foi sempre realizada em duplicado de forma a salvaguardar eventuais contaminações ou perdas de pontos de colheita.

2.3.2. Infecção da *Acanthamoeba castellanii*

Previamente à infecção, as amibas, com 48 h de crescimento, foram lavadas e ressuspensas em Meio de Infecção (MI) (Anexo II), sendo posteriormente contadas em câmara de Thomas. Para cada ponto de recolha da fase estacionária (**a** e **b**) foram preparados quatro frascos de cultura de 25 cm² (Sarstedt):

- Frascos teste (Ac + Lp + MI): 3
- Controlo negativo (Ac + MI): 1

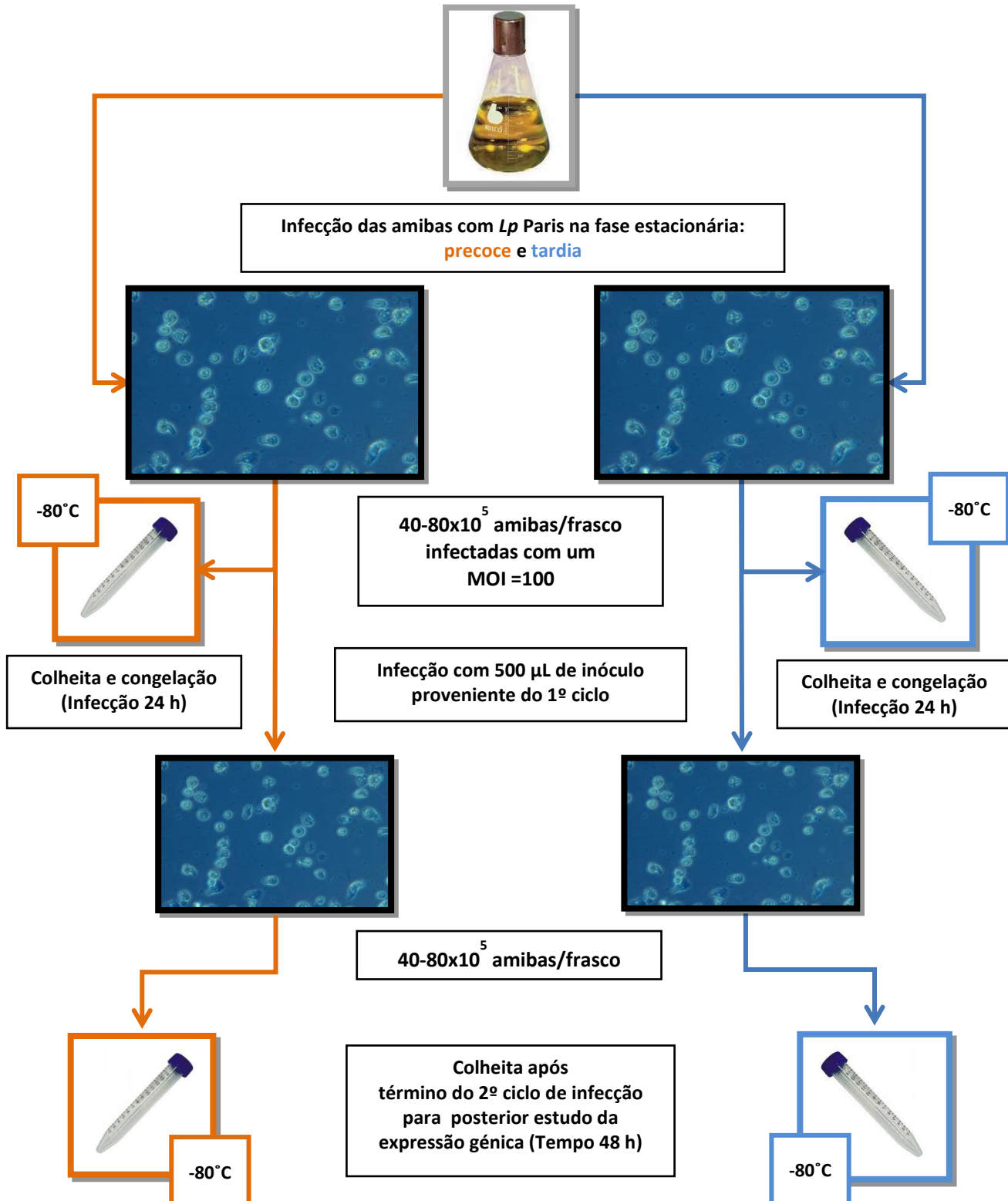
cada um destes contendo, entre 40 e 80 x 10⁵ amibas/frasco. As amibas dos frascos teste foram, posteriormente, infectadas na proporção de 1:100 (moi=100) com as suspensões preparadas no ponto 2.3.1., ajustando-se o volume final de cada frasco, com MI, até aos 6 ml. Posteriormente, incubaram-se as suspensões (37° C, 1 h) de forma a promover o processo de fagocitose. Findo o período estabelecido procedeu-se à lavagem do inóculo não fagocitado com MI, perfez-se o volume com o mesmo meio (6 ml) e incubou-se (37°C) durante o tempo necessário para que ocorresse lise de 90% das amibas.

2.3.3. Colheita e processamento das amostras pós-infecção

A determinação do critério de recolha (90% das amibas lisadas) foi avaliado, por observação microscópica, através da contagem do menor número de amibas infectadas, não lisadas, em cinco campos diferentes de cada frasco (ampliação: 400 X). Posteriormente, procedeu-se à raspagem e transferência do conteúdo de cada frasco para tubos individuais de 15 ml (livres de DNases e RNases), os quais foram continuamente mantidos em gelo. Por fim, colheram-se as amostras por centrifugação (14000 rpm, 5 minutos), decantou-se o sobrenadante e armazenou-se, a -80°C, até posterior utilização.

2.4. Fluxograma – Protocolo de infecção (Ciclo de 48 horas)

O protocolo de infecções sucessivas tentou recriar o processo natural de infecção e reinfeção das amibas durante um período máximo de 48 horas, tempo correspondente a dois ciclos infecciosos. Durante as primeiras 24 horas o protocolo de infecção decorreu tal como descrito anteriormente (pontos 2.3.1. a 2.3.3.).



2.4.1. Reinfecção da *Acanthamoeba castellanii*

Previamente ao início do segundo ciclo de infecção, prepararam-se três novos frascos teste e o respectivo controlo negativo, tal como descrito anteriormente (ponto 2.3.2.). A partir das suspensões dos frascos teste, provenientes do primeiro ciclo de 24 h, procedeu-se à infecção, com 500 µl, dos novos frascos teste. O período de fagocitose, lavagem e incubação decorreu como descrito no primeiro ciclo de 24 horas (ponto 2.3.2.).

2.4.2. Colheita e processamento das amostras pós-infecção

A determinação do critério de recolha e o processamento das amostras, para posterior congelação, decorreu como descrito no ciclo de 24 horas (ponto 2.3.3.).

2.4.3. Enumeração dos microrganismos viáveis em diferentes pontos do ciclo de infecção

De forma a compreender a dinâmica de multiplicação da Lp durante o processo de infecção (a partir de uma cultura em fase estacionária precoce), procedeu-se à detecção e enumeração dos microrganismos viáveis, em cinco momentos específicos, durante um período máximo de dois ciclos infecciosos:

- I. Preparação do inóculo
- II. Fim do período de adsorção
- III. Fim do primeiro ciclo
- IV. Fim do período de adsorção
- V. Fim do segundo ciclo

2.4.4. Determinação do número de UFC/ml da suspensão de inoculação (Ponto I)

A partir de 2 ml da suspensão de inoculação, preparada no início do primeiro ciclo de infecção, procedeu-se a elaboração de diluições sucessivas de base 10 (10^{-1} a 10^{-15}), em água estéril, num volume final de 1 ml. Cinquenta microlitros de cada diluição (10^{-3} a 10^{-15}) foram inoculados em BCYE- α , em duplicado, pelo método de Miles & Misra (Figura 3 e 4) (Miles, Misra, & Irwin, 1938). As placas foram incubadas a 37°C durante 5 dias.

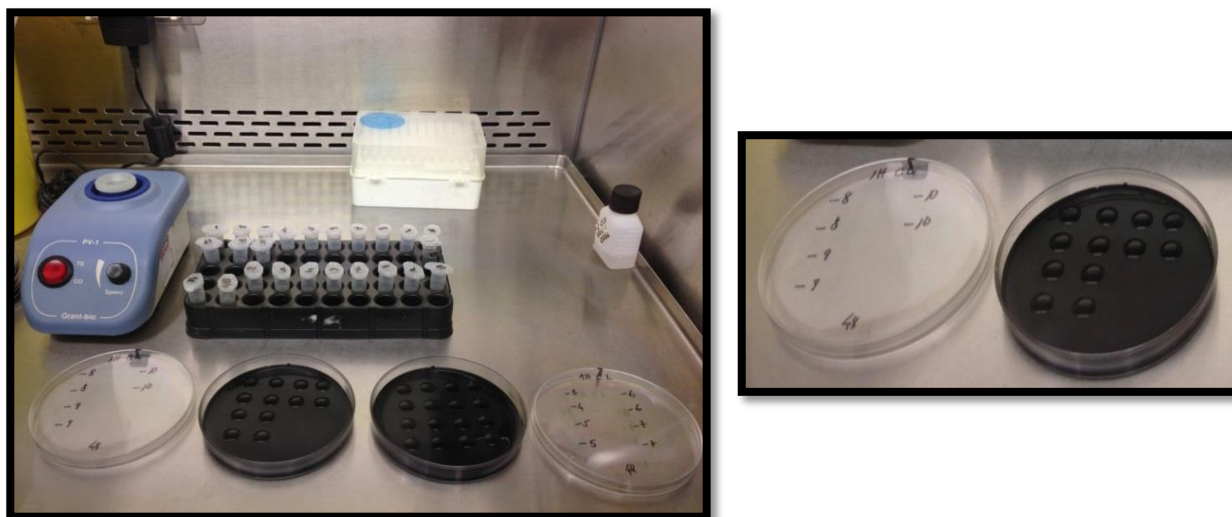


Figura 3 – Elaboração das diluições e inoculação em meio de BCYE- α

2.4.5. Determinação do número de Lp fagocitadas e presentes no sobrenadante (Pontos II e IV)

Após período de adsorção e de forma a determinar o número de células de Lp fagocitadas, procedeu-se à recolha do sobrenadante (contendo o inóculo não fagocitado) e das amibas aderentes. O sobrenadante foi recolhido para tubo de 15 ml estéril e as amibas, posteriormente ressuspensas em 2 ml de MI, para microtubo estéril de 1,5 ml.

A partir do sobrenadante foram elaboradas diluições sucessivas de base 10 (10^{-1} a 10^{-15}), em água estéril, num volume final de 1 ml. As diluições foram inoculadas, em BCYE- α , tal como descrito anteriormente (ponto 2.4.4.). As placas foram incubadas a 37°C durante 5 dias.

A suspensão de amibas foi sujeita a um tratamento de lise de forma a libertar os microrganismos fagocitados. Este processo consistiu na centrifugação da suspensão (14000 rpm, 5 minutos, 10°C), seguida de agitação em vortex (1 minuto) e à aspiração repetida e vigorosa do lisado através de agulha (27 Gauge). Findo este procedimento, procedeu-se à elaboração de diluições seriadas de base 10 (10^{-1} a 10^{-15}) e posterior inoculação, em BCYE- α , tal como descrito anteriormente (ponto 2.4.4.). As placas foram incubadas a 37°C durante 5 dias.

2.4.6. Determinação do número de UFC/ml após término do ciclo de infecção (Pontos III e V)

Após término do respectivo ciclo, procedeu-se à raspagem e transferência do conteúdo de cada frasco de 25 cm² para tubos de 15 ml estéreis. Findo este procedimento, procedeu-se à elaboração de diluições seriadas de base 10 (10^{-1} a 10^{-15}) e posterior inoculação em BCYE- α , tal como descrito anteriormente (ponto 2.4.4.). Incubaram-se as placas a 37°C durante 5 dias.

2.5. Avaliação dos efeitos da exposição da *Legionella pneumophila* a factores de “stress”

A sensibilidade ao sódio e a resistência ao choque osmótico são dois de vários factores de virulência que caracterizam a Lp em fase estacionária. Como tal, de forma a avaliar quais os efeitos da exposição de uma cultura de Lp, em fase estacionária precoce, a factores de “stress” e de que forma estes possam ser alterados pelo número de ciclo de infecção, procedeu-se à enumeração do número de microrganismos viáveis após exposição ao sódio e a uma solução saturada de cloreto de sódio, durante um período máximo de dois ciclos infecciosos. Ambos os parâmetros foram avaliados em três pontos específicos:

- I. Preparação da suspensão de inoculação
- II. Fim do primeiro ciclo
- III. Fim do segundo ciclo

2.5.1. Sensibilidade ao sódio

Para cada ponto de avaliação, recolheu-se 1 ml de suspensão seguida da elaboração de diluições sucessivas de base 10 (10^{-1} a 10^{-15}), em água estéril, num volume final de 1 ml. Cinquenta microlitros, de cada diluição (10^{-3} a 10^{-15}), foram inoculados em BCYE- α e BCYE- α + NaCl (Anexo II), em duplicado, tal como descrito anteriormente (ponto 2.4.4.). As placas foram incubadas a 37°C durante 7 dias.

2.5.2. Sensibilidade ao choque osmótico

Para cada ponto de avaliação, procedeu-se à transferência de 500 μ l de suspensão para dois microtubos, cada um destes contendo igual volume de AYE + Cloreto de Potássio (0,6 M) (Anexo II) e de meio AYE (Anexo II), respectivamente. Após incubação das suspensões (37°C, 1 h), procedeu-se à elaboração de diluições seriadas de base 10 (10^{-1} a 10^{-15}) e posterior inoculação em BCYE- α , em duplicado, tal como descrito anteriormente (ponto 2.4.4.). As placas foram incubadas a 37°C durante 5 dias.

2.6. Processamento das amostras para o estudo da expressão génica por PCR em tempo real

As amostras utilizadas para extracção de ARN total e consequente conversão em ADN complementar (ADNc), para posterior análise por RT-PCR, foram recolhidas a partir da cultura líquida de Lp Paris em fase estacionária (precoce e tardia) após um e dois ciclos de infecção em Ac.

2.6.1. Extracção, quantificação e avaliação da integridade do ARN total

O processo de extracção foi realizado com recurso ao sistema PureLink[®] RNA Mini Kit (Invitrogen) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante (Anexo I). De forma a melhorar o rendimento de extracção de ARN, introduziu-se uma adenda ao protocolo. Previamente à extracção por “kit”, procedeu-se à adição de 1 ml de TRIzol[®] a cada uma das amostras (Anexo I).

O TRIzol[®] (solução de fenol e isotiocianato de guanidina) é um reagente, pronto-a-usar, utilizado para o isolamento de ARN total de elevada qualidade (bem como o ADN e proteínas), a partir de amostras de tecidos e células de origem humana, animal, vegetal, leveduras e procariotas.

A quantificação e a pureza do ARN foram avaliadas por espectrofotometria, através da determinação da absorvância a 260 nm e do ratio A260/A280, respectivamente. Previamente à leitura, todos os extractos foram diluídos em água ultra pura (Invitrogen) na proporção de 1/50 num volume final de 102 µl.

Quantificação: $D.O.(260\text{ nm}) \times 40 \times \text{volume total} / \text{volume de extracto} = \text{ARN ng}/\mu\text{l}$

A avaliação da integridade das amostras foi efectuada através de electroforese em gel de agarose (Anexo IV).

2.6.2. Tratamento com DNase

A presença de ADN genómico numa amostra de ARN é um factor de contaminação importante que pode comprometer, de forma preponderante, os resultados finais de uma qualquer análise de expressão génica. Como tal, previamente à conversão das amostras de

ARN em ADNc, procedeu-se ao tratamento das mesmas com DNase. Este processo foi feito com recurso ao sistema TURBO DNA-free™ Kit (Ambion) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante (Anexo I).

2.6.3. Síntese de ADN complementar

Este processo foi feito com recurso com o sistema Superscript III® First Strand (Invitrogen) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante (Anexo I).

A eficácia do tratamento com DNase e a correcta conversão das amostras em ADNc foi confirmado através da amplificação do gene *mip* (Anexo IV). Os produtos amplificados foram posteriormente analisados por electroforese em gel de agarose (Anexo IV).

2.7. Estudo da expressão génica por PCR em tempo real

2.7.1. Selecção dos genes alvo e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

A selecção dos genes em estudo foi realizada com base numa análise de “microarray” realizada por Maria de Jesus Chasqueira (tese de doutoramento em preparação), na “Unité de Biologie des Bactéries Intracellulaires du Departement de Génomes et Génétique, Institute Pasteur de Paris”.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo (Anexo V) foram desenhados no âmbito de uma tese de mestrado (Cunha, 2013), através do programa *Primer Express*[®] *Software* (Applied Biosystems), de acordo com as especificações definidas (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Parâmetros	
Comprimento do oligonucleotídeo iniciador	40 – 9 pb
Temperatura de “melting”	60 - 58°C
Teor guanina - citosina	50 – 30 %
Amplificação	300 – 140 pb

O estudo da especificidade teórica foi avaliado com recurso ao programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST), sendo posteriormente submetidos a nova confirmação através do programa “Gene Runner” Versão 3.01 (Cunha, 2013).

2.7.2. PCR em tempo real

As amostras e os controlos negativos foram testados em duplicado, para cada gene, em placas de 96 poços ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems), usando ciclos de temperaturas universais: pré-incubação (2 minutos, 50°C; 10 minutos a 95°C) seguida de 40 ciclos (Desnaturação: 20 s, 95°C; Annealing: 30 s, 60°C; Extensão: 40 s, 72°C). Foram ainda adquiridas curvas de dissociação (15 s, 95°C; 1 minuto, 60°C; 15 s, 95°C) de modo a confirmar a amplificação de um único produto de reacção. As reacções foram realizadas com: 10 µl de SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µl de ADNc e 0,2

μM de cada oligonucleotídeo iniciador, num volume final de 20 μl por reacção. A girase (*gyrA*) foi utilizada como gene de normalização e a alteração relativa da expressão génica foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

2.7.3. Análise de dados

A análise de resultados foi efectuada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, o qual permite a comparação dos valores de “Cycle threshold” (C_t) das amostras em estudo (Lp pós infecção) face a um calibrador (Lp em fase estacionária precoce ou tardia). Os valores de C_t das amostras e do calibrador foram normalizados através do gene de referência (*gyrA*).

O cálculo da expressão relativa é o resultado da diferença entre a expressão génica na amostra em análise (Lp pós infecção) e a sua respectiva expressão na amostra calibradora (Lp em fase estacionária precoce ou tardia).

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ Alvo}} - C_{t \text{ gyrA}})_{\text{Tempo x}} - (C_{t \text{ Alvo}} - C_{t \text{ gyrA}})_{\text{Tempo 0}}$$

Tempo 0

- $C_{t \text{ Alvo}}$: gene alvo amostra calibradora (Lp em fase estacionária precoce ou tardia)
- $C_{t \text{ gyrA}}$: gene *gyrA* amostra calibradora (Lp em fase estacionária precoce ou tardia)

Tempo x

- $C_{t \text{ Alvo}}$: gene alvo na amostra em estudo (Lp após x horas (24 ou 48 h) de infecção em Ac)
- $C_{t \text{ gyrA}}$: gene alvo na amostra em estudo (Lp após x horas (24 ou 48 h) de infecção em Ac)

A indução (aumento de expressão) ou repressão (diminuição de expressão) de um gene é dado por um valor calculado, de $\Delta\Delta C_t$, positivo ou negativo, respectivamente. O número de vezes que essa expressão está aumentada ou diminuída face às amostras calibradoras, também designada por variação de expressão, foi calculado através da fórmula: $V = (2 \times \text{eficiência})^{\Delta\Delta C_t}$. Apenas foram consideradas alterações em que a diferença entre a expressão génica na amostra em análise e a sua respectiva expressão na amostra calibradora fosse superior ou igual a 3 x. Os resultados foram calculados utilizando a média de ensaios e não de ensaios individuais.

2.7.4. Reprodutibilidade intra e inter-ensaio

O estudo da reprodutibilidade intra e inter-ensaio foi avaliado através da realização de diluições (puro; 1/10; 10/100; 1/1000; 1/10000) de uma “pool” de ADNc de cinco genes (*gyrA*, *lpp0845*, *lpp1177*, *lpp0972*, *lpp2607*). As amostras de ADNc puras, as respectivas diluições e os controlos negativos foram testados em triplicado em placas de 96 poços ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems), tal como referido anteriormente (ponto 2.7.2.). Os ensaios foram realizados em triplicado, em três dias consecutivos. A precisão, dos parâmetros em análise, foi determinada pelo cálculo do coeficiente de variação (C_v).

2.7.5. Estudo da linearidade e da eficiência do PCR em tempo real

A linearidade do sistema foi determinada através da realização de diluições seriadas (puro; 1/10; 10/100; 1/1000; 1/10000) de uma “pool” de ADNc de cinco genes (*gyrA*, *lpp0845*, *lpp1177*, *lpp0972*, *lpp2607*). As amostras de ADNc puras e as respectivas diluições foram testados em triplicado em placas de 96 poços ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems), tal como referido anteriormente (ponto 2.7.2.). A linearidade foi calculada pela determinação do coeficiente de regressão linear (R^2).

Com o intuito de avaliar a eficiência de amplificação de cada um dos genes alvo, foram realizadas diluições seriadas de uma “pool” de ADNc (200; 20; 2; 0,2; 0,02 ng/μl), sendo posteriormente submetidas a amplificação, em triplicado, tal como descrito anteriormente (ponto 2.7.2.). Posteriormente, procedeu-se a uma análise de regressão linear entre as variáveis (C_t *versus* log da concentração de ADNc) e à determinação do declive da recta ($y = ax + b$).

O cálculo da eficiência (E) de amplificação foi inferido através da equação:

$$E = ([10^{-1/\text{declive}}] - 1) \times 100$$

3. Resultados

3.1. Infecções – Ciclo de 24 e 48 h

O estudo genotípico da dinâmica de infecção da Lp em fase estacionária, precoce e tardia, implicou a realização de seis ciclos de 24 h e de seis ciclos adicionais de 48 h, três dos quais para uma avaliação fenotípica paralela.

Durante o decorrer dos ciclos de 24 h e 48 h foram registados três parâmetros: i) o tempo médio, após inoculação em AYE, até que a cultura atingisse a fase estacionária; ii) o número médio de amibas/campo infectadas não lisadas no fim do ciclo de infecção; iii) o tempo médio de duração da infecção (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros de avaliação ao longo de um e dois ciclos de infecção de 24 h.

Parâmetros	Ciclo de 24 h		Ciclo de 48 h	
	Precoce	Tardia	Precoce	Tardia
Tempo médio (h), após inoculação em meio AYE, até atingir fase estacionária	23,5	26		
Número médio de amibas/campo infectadas não lisadas (fim do ciclo de infecção)	1,73	1,16	2,4	3,13
Tempo médio (h) de duração da infecção	24	23	21	20

Durante o primeiro ciclo de 24 h, a cultura líquida de Lp demorou em média, aproximadamente, 23 h 30 min até atingir a fase estacionária precoce e cerca de 26 h até atingir a fase estacionária tardia. Por sua vez, no fim do ciclo de infecção, registou-se um número médio de amibas infectadas não lisadas, por campo, de 1,73 e 1,16 e um tempo médio de infecção de 24 h e 23 h para as fases estacionária e precoce e tardia, respectivamente (Tabela 2).

Relativamente ao segundo ciclo de 24 h (ciclo de 48 h), observou-se um número médio de amibas infectadas não lisadas, por frasco, de 2,4 e 3,13 e um tempo médio de infecção de 21 h e 20 h para a fase estacionária precoce e tardia, respectivamente (Tabela 2).

3.2. Enumeração dos microrganismos viáveis em diferentes pontos do ciclo de infecção de 48 h

3.2.1. Determinação do número de UFC/ml de Lp presentes na suspensão de inoculação (1º ciclo)

O número médio de microrganismos presentes na suspensão de inoculação, em fase estacionária precoce, foi de $7,38 \times 10^8$ ufc/ml (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de microrganismos presentes na suspensão de inoculação.

Ensaio	Suspensão de inoculação (ufc/ml)
A	6,00E+08
B	6,00E+08
C	1,02E+09
Média	7,38E+08

3.2.2. Determinação do número de UFC/ml de Lp presentes no sobrenadante e no lisado das amibas após período de adsorção (1º ciclo)

Em média, a contagem do número de microrganismos efectuada no sobrenadante e no lisado das amibas foi de $1,62 \times 10^8$ ufc/ml e de $1,80 \times 10^7$ ufc/ml, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de microrganismos presentes no sobrenadante e no lisado, após período de adsorção, no início do primeiro ciclo.

Ensaio	Sobrenadante (ufc/ml)	Lisado (ufc/ml)
A	6,10E+07	2,90E+07
B	4,00E+08	1,50E+07
C	2,50E+07	1,00E+07
Média	1,62E+08	1,80E+07

3.2.3. Determinação do número de UFC/ml após término do ciclo de infecção (1º ciclo)

Em média, no fim do primeiro ciclo, o número de microrganismos resultantes do processo de replicação foi de $3,53 \times 10^8$ ufc/ml (Tabela 5).

Tabela 5 – Número de microrganismos no fim do primeiro ciclo de infecção.

Ensaio	Fim 1º ciclo (ufc/ml)
A	3,60E+08
B	4,00E+08
C	3,00E+08
Média	3,53E+08

3.2.4. Determinação do número de UFC/ml de Lp presentes na suspensão de inoculação (2º ciclo)

No início do segundo ciclo, o número médio de microrganismos inoculados foi de $1,77 \times 10^8$ ufc/ml (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de microrganismos presentes na suspensão de inoculação do segundo ciclo (500 µl de suspensão provenientes do fim do primeiro ciclo de infecção – Tabela 4).

Ensaio	Suspensão de inoculação (ufc/ml)
A	1,80E+08
B	2,00E+08
C	1,50E+08
Média	1,77E+08

3.2.5. Determinação do número de UFC/ml de Lp presentes no sobrenadante e no lisado após período de adsorção (2º ciclo)

Em média, a contagem do número de microrganismos efectuada no sobrenadante e no lisado das amibas foi de $3,23 \times 10^7$ ufc/ml e de $1,20 \times 10^7$ ufc/ml, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de microrganismos presentes no sobrenadante e no lisado, após período de adsorção, no início do segundo ciclo.

Ensaio	Sobrenadante (ufc/ml)	Lisado (ufc/ml)
A	1,90E+07	6,00E+06
B	5,30E+07	2,30E+07
C	2,50E+07	7,00E+06
Média	3,23E+07	1,20E+07

3.2.6. Determinação do número de UFC/ml após término do ciclo de infecção (2º ciclo)

O número de microrganismos resultantes do processo de replicação, no fim do segundo ciclo foi, em média, de $1,47 \times 10^8$ ufc/ml (Tabela 8).

Tabela 8 - Número de microrganismos no fim do segundo ciclo de infecção.

Ensaio	Fim 2º ciclo (ufc/ml)
A	1,50E+08
B	1,20E+08
C	1,70E+08
Média	1,47E+08

3.3. Avaliação dos efeitos da exposição da *Legionella pneumophila* a factores de “stress”

3.3.1. Sensibilidade ao sódio

A suspensão de inoculação inoculada em BCYE ($2,30 \times 10^9$ ufc/ml) apresentou valores médios de crescimento semelhantes aos observados em meio de BCYE + NaCl ($1,04 \times 10^9$ ufc/ml) (Tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação da sensibilidade da Lp ao sódio na suspensão de inoculação.

Ensaio	Suspensão de inoculação (ufc/ml)	
	BCYE	BCYE + NaCl
A	2,00E+09	1,40E+08
B	2,00E+09	2,20E+09
C	2,90E+09	7,80E+08
Média	2,30E+09	1,04E+09

No fim do primeiro e segundo ciclo de replicação, registaram-se valores médios de crescimento de $3,53 \times 10^8$ ufc/ml e $1,47 \times 10^8$ ufc/ml em BCYE e de $9,55 \times 10^8$ ufc/ml e $2,97 \times 10^7$ ufc/ml em BCYE + NaCl, respectivamente (Tabela 10 e Tabela 11).

Tabela 10 - Avaliação da sensibilidade da Lp ao sódio após término do primeiro ciclo de replicação.

Ensaio	Fim do 1º ciclo (ufc/ml)	
	BCYE	BCYE + NaCl
A	3,60E+08	9,10E+07
B	4,00E+08	2,40E+08
C	3,00E+08	1,00E+08
Média	3,53E+08	9,55E+07

Tabela 11– Avaliação da sensibilidade da Lp ao sódio após término do segundo ciclo de replicação.

Ensaio	Fim do 2º ciclo (ufc/ml)	
	BCYE	BCYE + NaCl
A	1,50E+08	4,50E+07
B	1,20E+08	3,80E+07
C	1,70E+08	6,00E+06
Média	1,47E+08	2,97E+07

3.3.2. Sensibilidade ao choque osmótico

A Lp, presente na suspensão de inoculação apresentou valores de crescimento médios de $3,73 \times 10^9$ ufc/ml e de $2,90 \times 10^7$ ufc/ml sem sujeição ao choque osmótico (AYE) e após choque osmótico (AYE + KCl), respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12 - Avaliação da sensibilidade da Lp ao choque osmótica na suspensão de inoculação.

Ensaio	Suspensão de inoculação (ufc/ml)	
	AYE	AYE + KCl
A	3,80E+09	4,40E+07
B	4,40E+09	-
C	3,00E+09	1,40E+07
Média	3,73E+09	2,90E+07

Após término do primeiro e segundo ciclo de replicação, registaram-se valores médios de crescimento de $4,80 \times 10^8$ ufc/ml e de $1,21 \times 10^8$ ufc/ml, em AYE, e de $4,53 \times 10^8$ ufc/ml e $2,13 \times 10^8$ ufc/ml, em AYE + KCl (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13 - Avaliação da sensibilidade da Lp ao choque osmótico após término do primeiro ciclo de replicação.

Ensaio	Fim do 1º ciclo (ufc/ml)	
	AYE	AYE + KCL
A	5,60E+08	3,80E+08
B	5,80E+08	5,40E+08
C	3,00E+08	4,40E+08
Média	4,80E+08	4,53E+08

Tabela 14 - Avaliação da sensibilidade da Lp ao choque osmótico após término do segundo ciclo de replicação.

Ensaio	Fim do 2º ciclo (ufc/ml)	
	AYE	AYE + KCl
A	1,20E+08	2,00E+08
B	1,60E+08	2,00E+08
C	8,40E+07	2,40E+08
Média	1,21E+08	2,13E+08

3.4. Processamento das amostras para o estudo da expressão génica por PCR em tempo real

3.4.1. Avaliação da integridade do ARN total

Todos os extractos de ARN total, sujeitos a electroforese em gel de agarose, após processo de extracção, apresentaram-se íntegros (bandas bem definidas e sem arrastamento) e sem aparente presença de ADN genómico. Verificou-se, também, a presença dos genes 23S e 16S do ARN ribossomal (Figura 4) pertencentes às subunidades 50S e 30S, respectivamente.

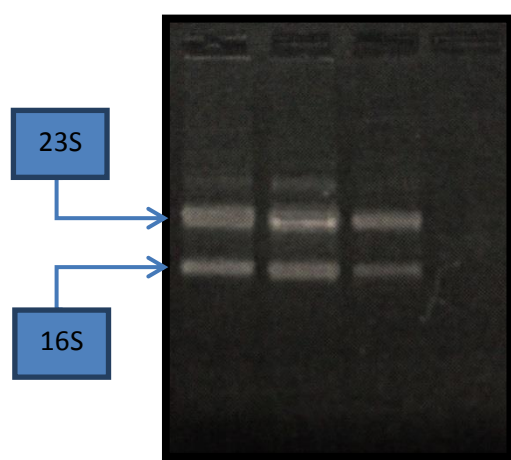


Figura 4 - Electroforese de três extractos de ARN total

3.4.2. Eficácia do tratamento com DNase e correcta síntese de ADNc

O tratamento das amostras com DNase, previamente à conversão em ADNc, mostrou-se efectivo, resultado confirmado pela não amplificação do gene *mip* em amostras de ARN não sujeitas a transcrição reversa. Todas as amostras sujeitas a transcrição apresentaram uma banda de peso molecular de 558 pb, correspondente à amplificação do gene *mip*.

3.5. Estudo da expressão génica por PCR em tempo real

3.5.1. Fase estacionária precoce – 24 h vs 48 h

No decorrer do primeiro ciclo de 24 h, observou-se indução de expressão de quatro de onze genes após infecção da Ac com Lp Paris em fase estacionária precoce (*lpp1330*, *lpp1177*, *lpp0972* e *lpp2607*) (Gráfico 1). Por sua vez, durante o segundo ciclo de 24 h, período correspondente ao ciclo de reinfecção, verificou-se indução de sete genes, três dos quais previamente induzidos (*lpp1177*, *lpp2607* e *lpp0972*) e quatro genes adicionais (*lpp1612b*, *lpp1316*, *lpp1900* e *lpp0845*). Observou-se, também, redução dos níveis de expressão do gene *lpp1330* (2x) e do gene *lpp1177* (8x). Não se observou repressão de nenhum gene (Gráfico 1).

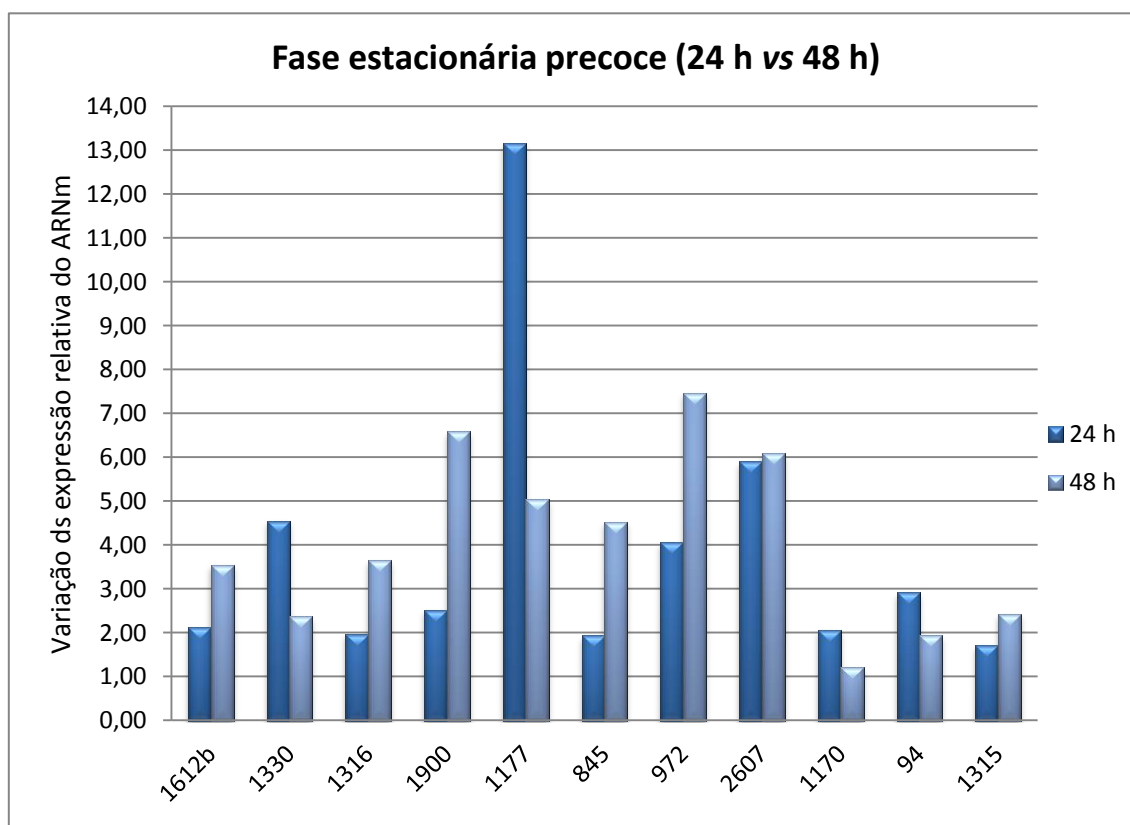


Gráfico 1 - Expressão relativa de *Lp* Paris, em fase estacionária precoce, após 24 h e 48 h de infecção em *A. castellanii*. Resultados calculados com base na média de seis ensaios, para o primeiro ciclo, e de três para o segundo ciclo (**Normalização** – *girase A*; **Amostra calibradora (24 h)** – gene respectivo no tempo 0 h; **Amostra calibradora (48 h)** – gene respectivo no tempo 24 h).

Em relação aos valores brutos de Ct todos os genes se apresentaram praticamente sem variação (≤ 1 Ct), à exceção de 5 genes (*gyrA*, *lpp1316*, *lpp0972*, *lpp1170* e *lpp1315*) que para o tempo 0 h e/ou 24 h tiveram variações de dois Ct em, pelo menos, duas réplicas (Tabela 15). No entanto, o coeficiente de variação foi sempre inferior a 1%.

Tabela 15– Valores de Ct após infecção da Ac com Lp em fase estacionária precoce. Média calculada com base em 6 (0 h e 24 h) ou 3 (48 h) ensaios. (σ – Cálculo do desvio padrão; C_v – Coeficiente de variação em %: $\sigma/\text{média} \times 100$).

Horas	Gene	Réplicas						Média	σ	C_v %
		Ct(1)	Ct(2)	Ct(3)	Ct(4)	Ct(5)	Ct(6)			
0	<i>gyrA</i>	21,38	21,38	22,2	22,28	21,07	22,85	21,3	0,07	0,332
		21,28	21,22	22,26	22,32	20,99	22,77			
24	<i>gyrA</i>	24,49	24,69	27,3	27,42	23,3	28,02	24,4	0,08	0,318
		24,38	24,52	27,57	27,51	23,22	27,62			
48	<i>gyrA</i>	27,37	26,64	27,62				27,3	0,12	0,441
		27,2	26,35	27,79						
0	<i>lpp1612b</i>	25,2	25,2	24,17	23,95	24,96	25,31	25,0	0,24	0,961
		24,86	25,5	23,88	24,01	25,12	25,29			
24	<i>lpp1612b</i>	27,85	28,74	28,27	28,42	27,82	28,26	27,7	0,20	0,715
		27,57	28,76	28,09	28,39	27,86	28,55			
48	<i>lpp1612b</i>	29,53	29,32	29,73				29,4	0,25	0,867
		29,17	29,18	29,52						
0	<i>lpp1330</i>	24,57	24,51	23,6	22,28	24,51	23,66	24,7	0,13	0,516
		24,75	24,57	23,6	22,36	24,72	23,7			
24	<i>lpp1330</i>	25,93	25,1	27,62	25,2	25,62	26,9	26,0	0,04	0,136
		25,98	24,8	27,6	24,91	26,03	27,13			
48	<i>lpp1330</i>	28,33	27,34	27,73				28,3	0,11	0,375
		28,18	27,18	27,69						
0	<i>lpp1316</i>	21,66	24,76	18,82	19,15	21,37	21,08	21,7	0,02	0,098
		21,69	24,75	18,84	19,18	21,38	21,1			
24	<i>lpp1316</i>	24,31	24,7	25,32	23,86	24,7	25,12	24,4	0,06	0,261
		24,4	24,62	25,52	23,92	24,62	25,05			
48	<i>lpp1316</i>	25,85	25,56	25,82				25,8	0,08	0,302
		25,74	25,31	25,88						
0	<i>lpp1900</i>	24,54	24,55	23,3	24,09	24,68	23,08	24,5	0,11	0,434
		24,39	24,44	23,26	24,14	24,61	23,09			
24	<i>lpp1900</i>	26,61	26,37	28,3	27,07	26,54	28,31	26,5	0,15	0,560
		26,4	26,64	28,53	27,17	26,46	28,55			
48	<i>lpp1900</i>	27,88	27,22	29,13				28,0	0,23	0,832
		28,21	27,29	28,93						
0	<i>lpp1177</i>	27,05	27,85	25,21	22,96	25,54	25,09	27,0	0,11	0,419

		26,89	27,03	25,32	23,03	25,5	25,17			
24	lpp1177	25,27	25,29	27,03	26,53	27,05	26,94	25,4	0,12	0,474
		25,44	25,45	27,07	26,19	27,02	26,94			
48	lpp1177	28,22	26,38	27,86				28,2	0,01	0,050
		28,24	26,27	27,82						
0	lpp0845	20,04	20,7	22,46	20,7	21,15	20,31	20,0	0,04	0,177
		19,99	20,59	22,43	20,7	21,17	20,36			
24	lpp0845	23,89	24,27	25,97	24,68	24,05	23,74	23,9	0,03	0,118
		23,85	24,17	25,94	24,69	24,02	24,03			
48	lpp0845	24,99	25,25	24,85				25,1	0,08	0,339
		25,11	25,17	24,88						
0	lpp0972	20,22	21,92	25,46	27,72	21,84	23,67	21,8	0,17	0,778
		20,03	21,68	25,27	27,39	21,98	23,73			
24	lpp0972	25,49	27,87	26,31	26,07	26,45	27,87	27,8	0,12	0,433
		25,48	27,7	26,02	25,87	26,47	27,7			
48	lpp0972	26,3	25,38	27,21				26,3	0,04	0,162
		26,24	25,42	27,36						
0	lpp2607	26,27	25,85	25,37	25,08	26,46	25,44	26,3	0,04	0,134
		26,32	25,71	25,46	25,14	26,82	25,44			
24	lpp2607	28,83	28,78	29,63	26,42	27,02	25,73	29,0	0,18	0,611
		29,08	28,55	29,49	26,54	27,06	25,66			
48	lpp2607	27,36	26,5	26,68				27,3	0,02	0,078
		27,33	26,56	26,49						
0	lpp1170	23,93	21,44	23,33	21,44	23,28	22,19	23,9	0,02	0,089
		23,9	21,42	23,48	21,42	23,12	22,34			
24	lpp1170	25,59	27,27	27,65	25,02	25,06	27,1	25,6	0,02	0,083
		25,62	27,34	27,6	25,19	25	27,22			
48	lpp1170	28,11	27,2	28,26				27,9	0,28	0,988
		27,72	27,08	28,46						
0	lpp0094	30,11	30,22	26,42	28,81	26,79	28,81	30,0	0,13	0,448
		29,92	29,78	26,54	28,87	27,15	28,87			
24	lpp0094	31,11	32,21	31,61	30,09	32,08	31,61	31,2	0,11	0,363
		31,27	32	31,73	30,07	32,14	31,73			
48	lpp0094	33,22	33,16	33,87				33,1	0,11	0,341
		33,06	33,09	33,7						
0	lpp1315	24,6	24,59	23,48	21,95	24,01	23,48	24,5	0,09	0,375
		24,47	24,3	23,64	21,88	24,06	23,65			
24	lpp1315	28,05	28,16	28,05	26,41	26,62	27,86	28,1	0,06	0,227
		28,14	28,28	28,14	26,27	26,76	27,82			
48	lpp1315	28,38	28,47	29,3				28,4	0,03	0,100
		28,34	28,49	29,21						

3.5.1.1. Fase estacionária tardia – 24 h vs 48 h

No decorrer do primeiro ciclo de 24 h, observou-se indução de expressão de dois genes após infecção da *Ac* com *Lp* Paris em fase estacionária tardia (*lpp1177*, *lpp2607*) (Gráfico 2). Por sua vez, durante o segundo ciclo de 24 h, período correspondente ao ciclo de reinfecção, observou-se repressão de três genes (*lpp1612b*, *lpp0972* e *lpp2607*), um dos quais previamente induzido no período correspondente ao primeiro ciclo de infecção (Gráfico 2).

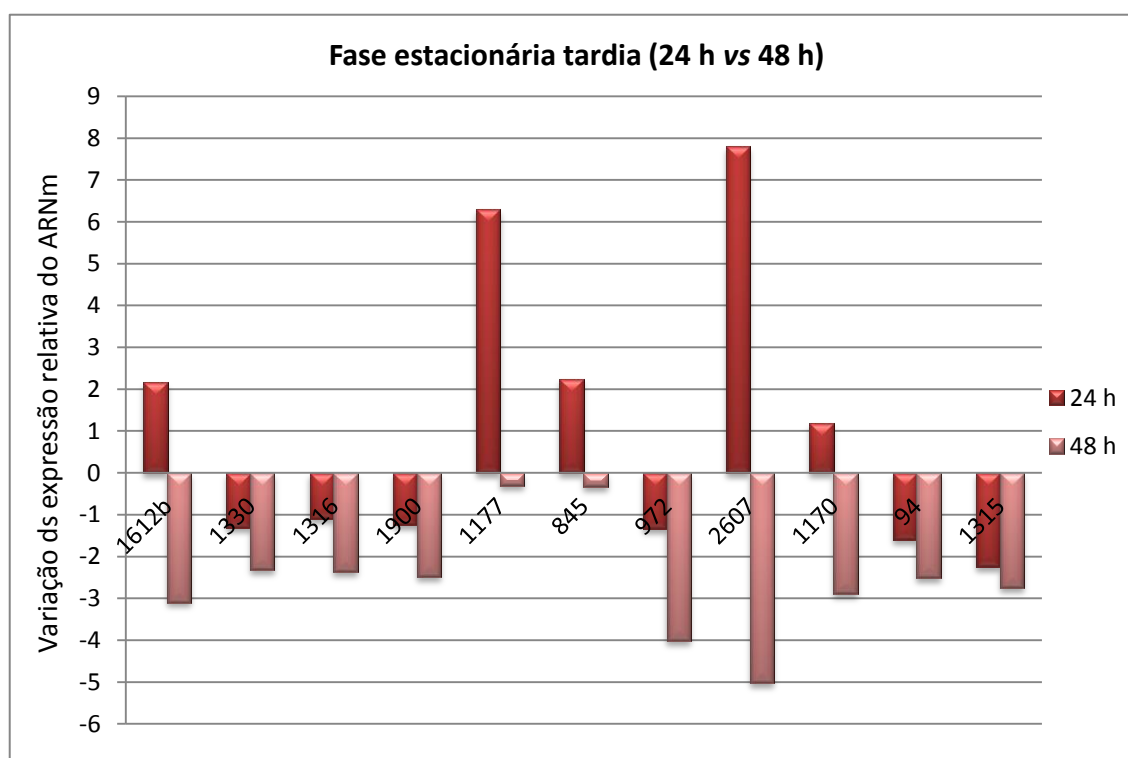


Gráfico 2 - Expressão relativa de *Lp* Paris, em fase estacionária tardia, após 24 h e 48 h de infecção em *A. castellanii*. Resultados calculados com base na média de seis ensaios, para o primeiro ciclo, e de um para o segundo ciclo (**Normalização** – *girase A*; **Amostra calibradora (24 h)** – gene respectivo no tempo 0 h; **Amostra calibradora (48 h)** – gene respectivo no tempo 24 h).

Em relação aos valores brutos de Ct todos os genes se apresentaram praticamente sem variação (≤ 1 Ct) à exceção de 7 genes (*gyrA*, *lpp1330*, *lpp1900*, *lpp1177*, *lpp0972*, *lpp2607* e *lpp1170*) que para o tempo 0 h e/ou 24 h tiveram variações de dois Ct em, pelo menos, duas réplicas (Tabela 16). O coeficiente de variação variou entre um mínimo de 0% e um máximo de 7,2%.

Tabela 16 – Valores de Ct após infecção da Ac com Lp em fase estacionária tardia. Média calculada com base em 6 (0 h e 24 h) ou 1 (48 h) ensaios. (σ – Cálculo do desvio padrão; C_v – Coeficiente de variação: $\sigma/\text{média} \times 100$).

Horas	Gene	Réplicas						Média	σ	C_v %
		Ct(1)	Ct(2)	Ct(3)	Ct(4)	Ct(5)	Ct(6)			
0	<i>gyrA</i>	21,17	21,14	21,99	21,95	20,54	21,14	21,3	0,58	2,739
		21,07	21,26	22,02	22,06	20,27	21,26			
24	<i>gyrA</i>	23,78	23,83	27,64	27,67	25,45	27,93	26,1	1,87	7,192
		23,94	23,73	27,77	28,03	25,37	27,58			
48	<i>gyrA</i>	23,66						23,6	0,07	0,299
		23,56								
0	<i>lpp1612b</i>	24,79	25,75	24,81	24,01	24,81	24,86	24,8	0,51	2,073
		24,43	25,62	24,78	24,12	24,78	24,47			
24	<i>lpp1612b</i>	27,23	28,85	28,8	28,09	28,8	28,85	28,5	0,58	2,055
		27,64	29,1	28,39	28,19	28,39	29,1			
48	<i>lpp1612b</i>	27,97						28,0	0,00	0,000
		27,97								
0	<i>lpp1330</i>	24,08	23,21	22,14	21,49	22,14	21,2	22,3	1,01	4,528
		23,84	23,02	22,03	21,47	22,03	21,04			
24	<i>lpp1330</i>	25,8	26,96	28,26	26,96	28,26	28,09	27,4	0,89	3,235
		26,01	27,15	28,04	27,15	28,04	28,34			
48	<i>lpp1330</i>	26,47						26,5	0,01	0,053
		26,45								
0	<i>lpp1316</i>	21,67	20,98	20,19	19,07	20,19	20,5	20,4	0,79	3,872
		21,49	20,88	20,18	19,16	20,18	20,48			
24	<i>lpp1316</i>	24,13	25,81	25,77	25,16	25,77	25,81	25,4	0,66	2,595
		24,11	25,87	25,86	25,3	25,86	25,87			
48	<i>lpp1316</i>	24,63						24,7	0,06	0,229
		24,71								
0	<i>lpp1900</i>	22,88	22,97	22,94	22,11	22,77	21,03	22,4	0,74	3,284
		22,82	22,86	23	22,15	22,71	20,94			
24	<i>lpp1900</i>	26,66	26,73	28,12	26,98	28,48	28,15	27,5	0,78	2,837
		26,48	27,02	28,2	27,04	28,44	28,24			
48	<i>lpp1900</i>	26,49						26,5	0,05	0,187
		26,56								
0	<i>lpp1177</i>	23,94	23,94	26,09	22,97	25,93	23,12	24,5	1,28	5,216
		23,97	23,76	26,1	23,07	26,03	25,39			
24	<i>lpp1177</i>	25,46	25,54	26,04	26,06	29,73	27,63	26,9	1,71	1,59
		25,49	25,5	26,01	26	29,74	27,59			
48	<i>lpp1177</i>	25,97						25,9	0,08	0,327
		25,85								
0	<i>lpp0845</i>	22,07	20,67	22,18	20,72	20,67	21,56	21,3	0,69	3,231
		22,01	20,61	22,18	20,66	20,61	21,27			

24	lpp0845	24,11	24,4	26,27	24,93	24,4	25,03	24,9	0,76	3,052
		24,19	24,41	26,41	25,05	24,41	25,11			
48	lpp0845	24,73						24,8	0,08	0,314
		24,84								
0	lpp0972	21,72	22,05	22,05	21,27	19	22,47	21,4	1,23	5,741
		21,4	21,89	21,89	21,29	18,89	22,79			
24	lpp0972	26,06	27,81	27,81	24,79	26,26	27,81	26,8	1,20	4,489
		26,13	27,94	27,94	24,92	26,44	27,94			
48	lpp0972	25,08						25,1	0,02	0,085
		25,05								
0	lpp2607	25,89	25,18	24,76	23,53	24,69	22,95	24,5	0,99	4,052
		25,72	25,07	24,72	23,76	24,86	22,93			
24	lpp2607	26,93	25,82	24,58	28,77	25,87	26,67	26,4	1,35	5,097
		25,92	25,91	24,79	28,93	25,76	26,76			
48	lpp2607	26,39						26,3	0,06	0,242
		26,3								
0	lpp1170	23,05	22,56	22,5	22,56	21,2	22,5	22,4	0,56	2,482
		22,9	22,63	22,34	22,63	21,35	22,34			
24	lpp1170	25,32	27,52	27,46	27,52	25,89	27,46	26,9	0,96	3,584
		25,39	27,53	27,71	27,53	25,93	27,71			
48	lpp1170	25,7						25,6	0,09	0,359
		25,57								
0	lpp0094	27,99	27,74	27	25,9	27,74	27,74	27,2	0,66	2,441
		27,74	27,21	26,96	26,07	27,21	27,21			
24	lpp0094	31,57	32,5	32,5	32,31	33,6	31,57	32,5	0,81	2,483
		32,01	32,39	32,39	32,31	34,41	32,01			
48	lpp0094	32,01						31,8	0,24	0,755
		31,67								
0	lpp1315	23,99	23,8	23,26	23,26	23,09	23,8	23,5	0,31	1,330
		23,87	23,5	23,24	23,24	23,18	23,5			
24	lpp1315	27,57	28,78	28,1	28,1	27,57	28,78	28,3	0,61	2,156
		27,55	29,12	28,42	28,42	27,55	29,12			
48	lpp1315	27,35						27,2	0,19	0,702
		27,08								

Nota: Às 48 h (células a cinzento), apenas se apresentaram valores de uma réplica dado o baixo rendimento de extracção de ARN.

3.5.2. Fase estacionária precoce e tardia - 0 h vs 48 h

Após dois ciclos de infecção de 24 h, infectadas com *Lp* em fase estacionária precoce, registou-se indução de seis genes (*lpp1330*, *lpp1900*, *lpp1177*, *lpp0845*, *lpp0972*, *lpp2607*), não se tendo observado repressão significativa de nenhum dos genes em análise (Gráfico 3).

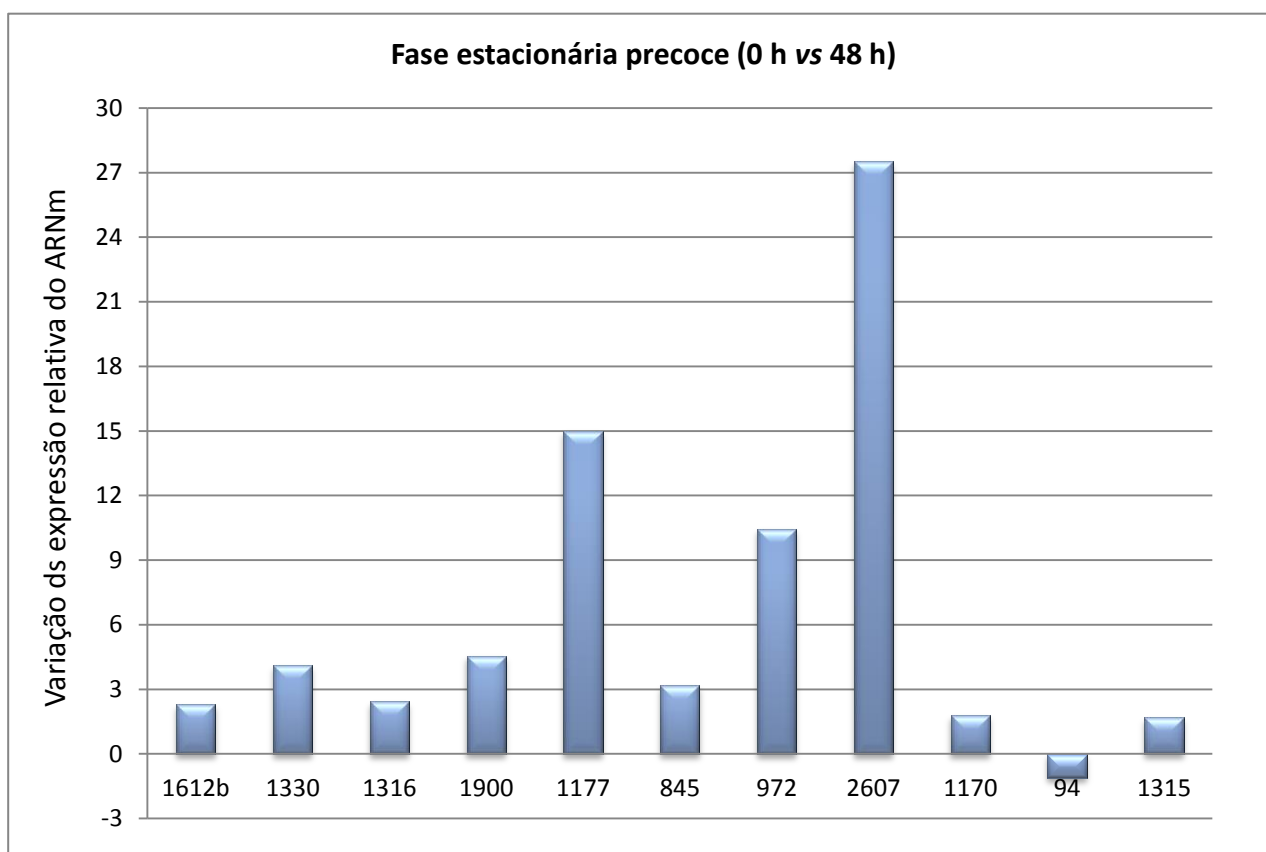


Gráfico 3 - Expressão relativa de *Lp* Paris, em fase estacionária precoce, após 48 h de infecção em *A. castellanii*. Resultados calculados com base na média de seis ensaios. (**Normalização** – *girase A*; **Amostra calibradora** – gene respectivo no tempo 0h).

Durante a fase estacionária tardia, os genes *lpp1330*, *lpp1316* e *lpp0094* foram reprimidos (Gráfico 4).

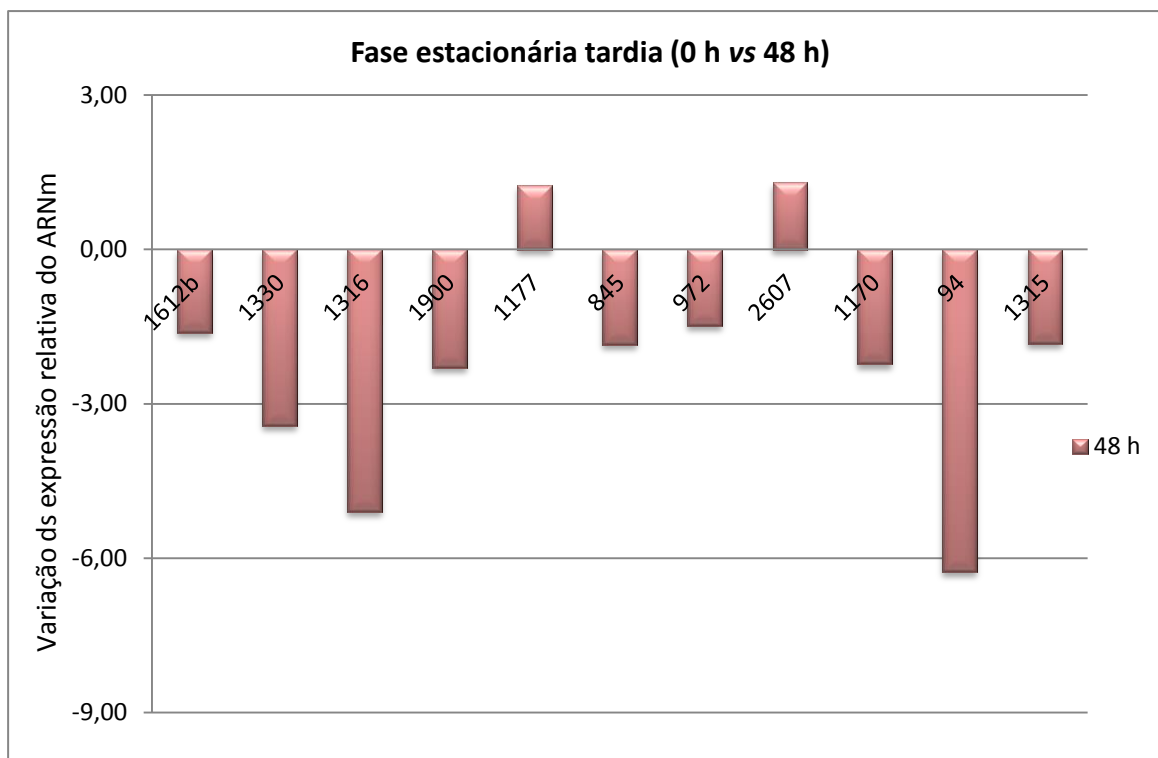


Gráfico 4 - Expressão relativa de *Lp Paris*, em fase estacionária tardia, após 48 h de infecção em *A. castellanii*. Resultados calculados com base na média de seis ensaios. (**Normalização** – *girase A*; **Amostra calibradora** - gene respectivo no tempo 0 h).

3.5.3. Estudo da reprodutibilidade intra-ensaio

O coeficiente de variação intra-ensaio oscilou entre um mínimo de 0 % e um máximo de 2,88 %. Em média, os valores de C_v por réplica são inferiores a 1% (Tabela 17).

Tabela 17 - Estudo da reprodutibilidade intra-ensaio de cinco genes (*gyrA*, *lpp1177*, *lpp2607*, *lpp0845* e *lpp0972*) pela determinação do coeficiente de variação (C_v do triplicado de cada diluição) de cada um dos três ensaios (E1, E2 e E3). (C_t – Média dos valores de C_t do triplicado de cada diluição; σ – Desvio padrão do triplicado dos valores de C_t).

Gene	Diluição	Ct (Média)				σ				C_v %		
		E1	E2	E3		E1	E2	E3		E1	E2	E3
<i>gyrA</i>	Puro	20,09	20,17	20,01		0,08	0	0,02		0,42	0	0,11
	1:10	23,22	24,76	24,95		0,10	0,05	0,10		0,45	0,23	0,40
	1:100	26,70	28,03	28,48		0,07	0,04	0,08		0,26	0,16	0,29
	1:1000	30,77	31,56	32		0,20	0,45	0,29		0,64	1,47	0,92
	1:10000	34,88	36	35,9		0,39	0,56	0,57		1,12	1,54	1,59
<i>lpp1177</i>	Puro	26,97	27,44	27,05		0,11	0,57	0,02		0,42	2,11	0,10
	1:10	28,77	30,37	30,36		0,22	0,19	0,03		0,76	0,62	0,14
	1:100	32,18	34,02	34,54		0,39	0,98	0,17		1,21	2,88	1,97
	1:1000	35,66	-	36,95		0	-	0,25		0	-	2,02
	1:10000	-	-	39,45		-	0	0,08		-	-	0
<i>lpp2607</i>	Puro	26,29	23,25	23,28		0,03	0	0,03		0,13	0,03	0,12
	1:10	27,65	29,27	29,34		0,18	0,08	0,17		0,65	0,25	0,57
	1:100	31,37	32,86	33,07		0,41	0,19	0,48		1,30	0,58	1,46
	1:1000	33,42	37,07	36,61		0	0,18	0,64		0	0,49	1,75
	1:10000	36	37,26	37,26		0	0	0		0	0	0
<i>lpp0845</i>	Puro	22,24	22,24	20,64		0,07	0,07	0,07		0,31	0,31	0,37
	1:10	22,06	23,66	23,73		0,02	0,08	0,06		0,09	0,36	0,28
	1:100	26,01	27,26	27,67		0,02	0,11	0,11		0,08	0,39	0,42
	1:1000	29,57	31,22	31,56		0,26	0,11	0,05		0,89	0,34	0,17
	1:10000	33,76	34,64	35,28		0,67	0,17	0,60		1,99	0,50	1,70
<i>lpp0972</i>	Puro	20,12	21,8	19,31		0,13	0,17	0,07		0,66	0,77	0,36
	1:10	22,13	23,08	23,43		0,03	0,04	0,03		0,14	0,15	0,11
	1:100	25,96	27,27	27,42		0,27	0,22	0,17		1,04	0,84	0,64
	1:1000	29,75	31,08	31,46		0,23	0,23	0,25		0,79	0,74	0,80
	1:10000	34,41	35,27	35,33		0,14	0,50	0,08		0,42	1,43	0,23

3.5.4. Estudo da reprodutibilidade inter-ensaio

O coeficiente de variação inter-ensaio oscilou entre um mínimo de 0 % e um máximo de 6,22 %. Em média, os maiores valores de C_v são observados nas diluições 1:10 e 1:100 com tendência a decrescer nas diluições subsequentes. Os menores valores de C_v são observados, em média, na “pool” de ADNc não sujeita a diluição (puro) (Tabela 18).

Tabela 18 - Estudo da reprodutibilidade inter-ensaio de cinco genes (*gyrA*, *lpp1177*, *lpp2607*, *lpp0845* e *lpp0972*) através do cálculo do coeficiente de variação resultante da média de três ensaios. (Ct – Média dos valores de Ct de três ensaios; σ – Desvio padrão dos valores de Ct de três ensaios).

Gene	Diluição	Ct (Média)	σ	C_v %
<i>gyrA</i>	Puro	20,09	0,04	0,22
	1:10	24,31	0,95	3,90
	1:100	27,74	0,93	3,35
	1:1000	31,45	0,62	1,98
	1:10000	35,62	0,65	1,82
<i>lpp1177</i>	Puro	27,15	0,25	0,93
	1:10	29,83	0,92	3,07
	1:100	33,58	1,24	3,69
	1:1000	36,30	0,91	2,51
	1:10000	39,45	0	0
<i>lpp2607</i>	Puro	23,26	0,01	0,06
	1:10	28,76	0,95	3,32
	1:100	32,44	0,93	2,85
	1:1000	35,70	1,98	5,57
	1:10000	36,84	0,73	1,97
<i>lpp0845</i>	Puro	21,71	0	0,02
	1:10	23,15	0,94	4,08
	1:100	26,98	0,87	3,21
	1:1000	30,65	0,94	3,05
	1:10000	34,56	0,76	2,20
<i>lpp0972</i>	Puro	20,41	1,26	6,22
	1:10	23,12	0,87	3,79
	1:100	26,88	0,79	2,9
	1:1000	30,76	0,89	2,9
	1:10000	35	0,51	1,46

3.5.5. Estudo da linearidade

A linearidade dos cinco genes analisados (*gyrA*, *lpp1177*, *lpp2607*, *lpp0845* e *lpp0972*), avaliada pelo coeficiente de regressão linear (R^2), oscilou entre um mínimo de 0,9337, para o gene *lpp0845*, e um máximo de 0,9931 para o gene *lpp0972* ($0 \leq R^2 \leq 1$) (Tabela 19).

Tabela 19 - Coeficiente de regressão linear dos genes *gyrA*, *lpp1177*, *lpp2607*, *lpp0845* e *lpp0972*.

Genes	R^2
<i>gyrA</i>	0,9866
<i>lpp1177</i>	0,9878
<i>lpp2607</i>	0,9875
<i>lpp0845</i>	0,9337
<i>lpp0972</i>	0,9931

3.5.6. Cálculo da eficiência (E)

A eficiência de amplificação dos cinco genes analisados (*gyrA*, *lpp1177*, *lpp2607*, *lpp0845* e *lpp0972*) oscilou entre um mínimo de 90,18 %, para o gene *lpp2607*, e um máximo de 112 % para o gene *lpp0845*. Em média, as eficiências de amplificação são superiores a 90 % (Tabela 20).

Tabela 20 - Cálculo da eficiência de amplificação dos genes: *gyrA*, *lpp1177*, *lpp2607*, *lpp0845* e *lpp0972*.

Genes	E (%)
<i>gyrA</i>	93,07
<i>lpp1177</i>	105,35
<i>lpp2607</i>	90,18
<i>lpp0845</i>	112
<i>lpp0972</i>	92,48

4. Discussão

O presente trabalho experimental teve quatro objectivos principais, o primeiro dos quais teve como propósito a compreensão da dinâmica de multiplicação da Lp, através da quantificação do número de microrganismos viáveis em diferentes pontos críticos do ciclo de infecção de 48 h.

No início do primeiro ciclo de 24 h, procedeu-se à determinação da percentagem de microrganismos adsorvidos e à contagem do número de microrganismos viáveis, após término do mesmo, tendo como principal objectivo compreender se a dinâmica de multiplicação *in vitro* se alteraria após co-cultura em Ac. Do valor médio de microrganismos presentes na suspensão de inoculação ($7,38 \times 10^8$ ufc/ml), colocada em contacto com as amibas, apenas 2,83% foram internalizados e 97,17% ficaram em suspensão no sobrenadante. Porém, apesar da percentagem média de adsorção ser baixa, registou-se um número médio de microrganismos viáveis no término do ciclo de $3,53 \times 10^8$ ufc/ml, fazendo pressupor que a infecção na amiba potencia e aumenta o número de Lp mesmo com baixas percentagens de internalização. No entanto, é de salvaguardar que os resultados de internalização não são reprodutíveis, apresentando valores de adsorção por ensaio, de 4,83%, 2,50% e 0,98%.

O segundo ciclo de infecção de 24 h, teve como principal objectivo determinar qual a influência do número de ciclos sobre a dinâmica de infecção da Lp. Durante este segundo ciclo de replicação registou-se um ligeiro aumento da percentagem média de adsorção (6,28%) dos microrganismos presentes na suspensão de inoculação ($1,77 \times 10^8$ ufc/ml). Porém, após análise das percentagens de adsorção individuais (3,33%, 11,50% e 4,67%) face ao período de 24 h precedente (4,83%, 2,50% e 0,98) e do número de microrganismos resultantes dos respectivos ciclos de replicação, podemos inferir que a capacidade invasiva parece aumentar durante o segundo ciclo, não se reflectindo, no entanto, num consequente aumento do número de microrganismos viáveis no fim da infecção.

O segundo objectivo do trabalho passou pela avaliação da sensibilidade ao sódio e ao choque osmótico ao longo dos ciclos de 48 h. Estudos de como a Lp reconhece e responde aos distintos ambientes extra e intracelulares, têm permitido a identificação de uma ligação entre a fase de crescimento e a expressão de características previamente

correlacionadas com a virulência. A sensibilidade ao sódio e a sensibilidade ao choque osmótico, são dois factores de virulência que se encontram regulados pela fase do ciclo de crescimento (Byrne & Swanson, 1998), parâmetros avaliados durante o presente estudo na suspensão de inoculação e após término do primeiro e segundo ciclo de replicação do ciclo de 48 h.

À excepção da suspensão de inoculação, que registou valores de crescimento muito semelhantes tanto em meio com e sem adição de cloreto de sódio, todos os restantes pontos de avaliação registaram um ligeiro decréscimo do número de microrganismos viáveis aquando da sua inoculação em meio com sódio. Entre o fim do primeiro e do segundo ciclo, a sensibilidade da cultura ao sódio não aparenta sofrer qualquer alteração, registando-se valores de crescimento semelhantes tanto em BCYE como em BCYE + NaCl. Sabendo que a Lp em fase exponencial é resistente ao sódio e sensível ao mesmo em fase pós-exponencial (Byrne & Swanson, 1998; Joshi & Swanson, 1999), pode deduzir-se, pelos dados anteriormente apresentados, que a Lp não sofre alteração do seu perfil de sensibilidade com o número de ciclos de infecção.

Ao contrário do que se havia constatado na avaliação da sensibilidade ao sódio, apenas se registou decréscimo dos valores de crescimento na suspensão de inoculação exposta a uma solução de cloreto de potássio. No entanto, ao contrário que já havia sido reportado por vários autores, a Lp exhibe comportamento de resistência ao choque osmótico em fase pós-exponencial (Byrne & Swanson, 1998; Joshi & Swanson, 1999; Hammer, Tateda & Swanson, 2002). Todos os restantes pontos de análise (fim do primeiro e segundo ciclo) apresentaram valores de crescimento muito semelhantes posteriormente à exposição a meio com e sem adição de cloreto de potássio. Também não se observaram discrepâncias de crescimento acentuadas entre ciclos, sugerindo, em conformidade com a análise de sensibilidade ao sódio, que o padrão de expressão fenotípica se mantém inalterado entre infecções.

Os dois últimos objectivos do trabalho, tiveram como intuito quantificar diferenças nos níveis de expressão génica da Lp após ciclo de infecção de 24 h em Ac, com culturas em fase estacionária precoce e tardia, e determinar qual o efeito de consecutivos ciclos de infecção no padrão de expressão.

No decorrer do primeiro ciclo de 24 h, após infecção com Lp em fase estacionária precoce, registou-se indução de quatro genes (*lpp1177*, *lpp2607*, *lpp1330e* *lpp0972*) com um aumento dos níveis de expressão, face à amostra calibradora, de 13x, 6x, 5x e 4x,

respectivamente. O gene *lpp0972* encontra-se descrito, em termos funcionais, como semelhante à proteína *enhA* (“Enhanced entry protein”), um factor de virulência predominantemente expresso durante a fase transmissiva, em correspondência com o que foi descrito por Brüggemann *et al.* (2006). Nenhum dos restantes genes tem função descrita, sabendo-se apenas que codificam para proteínas hipotéticas.

Por sua vez, durante o segundo ciclo de 24 h, observou-se indução de quatro genes adicionais (*lpp1612b*, *lpp1316*, *lpp1900* e *lpp0845*), sendo que três (*lpp1177*, *lpp2607* e *lpp0972*) se mantiveram induzidos ao longo do primeiro e segundo ciclo das infecções de 48 h. Este padrão de contínua indução reforça a ideia da sua eventual importância para o processo de invasão celular. Contudo, apesar do padrão de indução contínuo, os níveis de expressão não se mantiveram estáveis, à excepção do gene *lpp2607*. Os genes *lpp1177* e *lpp1330* reduziram a sua expressão em 8x e 2x, respectivamente, ao contrário do observado para o gene *lpp0972* que teve um aumento de 3,5x face ao período anterior.

De todos os genes induzidos, ao longo do segundo ciclo, apenas se desconhece a função de *lpp1900*, sabendo-se apenas que codifica para uma proteína hipotética. O gene *lpp1612b* codifica para a proteína C-terminal *sidB*, uma de várias proteínas pertencentes ao sistema Dot/Icm, também este responsável pelo processo de invasão celular (Newton, Ang, Van Driel, & Hartland, 2010). O gene *lpp1316* codifica para a proteína LspG, pertencente ao sistema de secreção tipo II (T2SS). Num estudo realizado por Rossier, Starkenburg e Cianciotto (2004), foi confirmado, através da construção de mutantes de Lp para Lsp, que os genes pertencentes ao sistema de secreção T2SS, são necessários para a infecção de amibas e macrófagos alveolares humanos, podendo assim justificar a indução deste gene nesta fase do ciclo. O gene *lpp0845*, que codifica para a proteína reguladora global CsrA, apresentou-se induzido, à semelhança do que foi descrito por Brüggemann *et al.*, em 2006.

No decorrer do primeiro ciclo de 24 h, desta vez após infecção com Lp em fase estacionária tardia, observou-se indução dos genes *lpp1177* e *lpp2607* com um aumento dos níveis de expressão, face à amostra calibradora, de 6x e 8x, respectivamente.

Durante o segundo ciclo de 24 h, registou-se repressão dos genes *lpp1612b*, *lpp0972*, com níveis de expressão face à amostra calibradora de -3x e -4x, respectivamente, e um decréscimo acentuado dos níveis de expressão dos genes *lpp1177* (-0,5x) e *lpp2607* (-5x). É de salvaguardar que os níveis de expressão do segundo ciclo são o resultado de apenas uma réplica, sendo necessário averiguar se a sua expressão se mantém constante, ou não, entre diferentes ensaios biológicos.

Contrariamente ao que se havia observado ao longo da infecção de 48 h em fase estacionária precoce, a maioria dos genes encontra-se subexpresso e com tendência a diminuir os níveis de expressão aquando da passagem do primeiro para o segundo ciclo de 24 h. O facto de a infecção ter sido efectuada a partir de uma cultura de Lp em fase estacionária tardia, em que o nível de “stress” metabólico é mais acentuado do que na fase estacionária precoce, pode ser suficiente para justificar este padrão de subexpressão. É de salientar que apesar do processo de infecção não aparentar qualquer comprometimento, uma vez que a Lp manteve intacta a sua capacidade invasiva, replicativa e transmissiva, o padrão de expressão é muito diferente do que o encontrado durante uma infecção em fase estacionária precoce.

Sendo a Lp um patógeno intracelular, especula-se que a entrada e consequente replicação nas células hospedeiras serão dois pontos críticos para a sua capacidade de causar doença (Cirillo *et al.*, 1999). Assim sendo, comparando o padrão de expressão da Lp após dois ciclos replicativos (48 h) em relação à sua expressão em cultura líquida (0 h), constatou-se que seis genes (*lpp1330*, *lpp1900*, *lpp1177*, *lpp0845*, *lpp0972* e *lpp2607*) foram induzidos após infecção com Lp em fase estacionária precoce e três (*lpp1330*, *lpp1316* e *lpp0094*) foram reprimidos após infecção com Lp em fase estacionária tardia, não se observando alterações significativas nos restantes genes em análise. O gene *lpp2607* manteve-se induzido em ambas as fases da infecção, à semelhança do que se tem vindo a observar ao longo dos diferentes ciclos.

Todos estes dados vêm reforçar a ideia que o ciclo de infecção no hospedeiro protozoário é importante para a activação de determinados genes e que os seus níveis de expressão aparentam ser modulados após infecção. Contudo, alguns dos genes analisados e dos quais se desconhece função, ainda necessitam de caracterização aprofundada para que se possa concluir qual a sua função no ciclo de vida da Lp.

5. Conclusão

O ciclo de replicação da Lp na amíba é um ponto-chave de extrema importância para o aumento do número deste microrganismo no ambiente. Mesmo quando as percentagens de internalização são extremamente baixas, tal como registadas nos nossos ensaios, o número de microrganismos parece ser exponenciado a níveis iguais ou muito semelhantes aos que se observaram na cultura líquida em fase estacionária. No entanto, apesar da capacidade invasiva parecer estar aumentada após um ciclo de replicação, esta não se reflectiu, consequentemente, num aumento do número de microrganismos no término da infecção. Assim sendo, pode concluir-se que o “factor multiplicação” poderá ser mais importante em ciclos de infecção iniciais e o factor “capacidade invasiva” poderá ser mais importante em ciclos de infecção sucedâneos.

Relativamente à sensibilidade ao sódio e ao choque osmótico, pode concluir-se que as culturas de Lp mantêm níveis de sensibilidade semelhantes ao cloreto de sódio, após um e dois ciclos de infecção, registando o mesmo comportamento, neste caso de resistência, em relação ao cloreto de potássio.

Do estudo da expressão génica, pode concluir-se que infecções realizadas com Lp em fase estacionária precoce e tardia apresentam padrões de modulação distintos entre si. As infecções realizadas com Lp em fase estacionária precoce parecem ter um efeito de indução sobre vários genes, efeito aparentemente potenciado com o aumento do número de ciclos. No entanto, os níveis de expressão não são constantes entre ciclos, fazendo pressupor que a função dos genes é modulada consoante as necessidades da Lp. Por sua vez, as infecções realizadas com Lp em fase estacionária tardia demonstraram, ao contrário do que se observou em fase estacionária precoce, indução de um baixo número de genes, durante o primeiro ciclo, e tendência à subexpressão ou mesmo repressão no ciclo de infecção subsequente. Este padrão faz pensar que o “stress” metabólico pode exercer uma grande pressão sobre o padrão de expressão génica e, eventualmente, comprometer o ciclo de infecção da Lp ou a dinâmica de replicação no hospedeiro protozoário.

Estudos futuros que avaliem qual o efeito da inactivação dos genes com maior nível de expressão (indução ou repressão), poderão constituir um passo importante para a compreensão da sua função no ciclo de infecção em Ac e, eventualmente, em linhas celulares de macrófagos alveolares humanos.

6. Bibliografia

Al-Quadan, T., Price, C. T., & Kwaik, A. Y. (2012). Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends in Microbiology*, 20(6), 299-306.

Amer, A. O., & Swanson, M. S. (2002). A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Current Opinion in Microbiology*, 5(1), 56-61.
doi:10.1016/S1369-5274(02)00286-2

Aurell, H., Etienne, J., & Forey, F. (2003). *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3320–3322.

Bachman, M. A., & Swanson, M. S. (2004). The LetE protein enhances expression of multiple LetA/LetS-dependent transmission traits by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 72(6), 3284-3293.
doi: 10.1128/IAI.72.6.3284-3293.2004

Ballard, A. L., Fry, N. K., Chan, L., Surman, S. B., Lee, J. V., Harrison, T. G., & Towner, K. J. (2000). Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4215-4218.

Benin, A. L., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). Trends in Legionnaires' disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clinical Infectious Diseases*, 35(9), 1039-1046.

Benson, R. F., & Fields, B. S. (1998). Classification of the genus *Legionella*. *Seminars in Respiratory Infections*, 13(2), 90-99.

Berdal, B. P., Farshy, C. E., & Feeley, J. C. (1979). Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 9(5), 575-578.

Birtles, R. J., Harrison, T. G., Samuel, D., & Taylor, A. G. (1990). Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosing *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection. *Journal of Clinical Pathology*, 43(8), 685-690.

Blasi, F. (2004). Atypical pathogens and respiratory tract infections. *The European Respiratory Journal*, 24(1), 171-181.

Boswell, T. C., Marshall, L. E., & Kudesia, G. (1996). False-positive *Legionella* titres in routine clinical serology testing detected by absorption with campylobacter: implications for the serological diagnosis of legionnaires' disease. *The Journal of Infection*, 32(1), 23-26.

Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Bürgmann, H. (2012). Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4481-4489.

Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Gorman, G. W., Weaver, R. E., Feeley, J. C., Cordes, L. G., Wilkinson, H. W., Patton, C., Thomason, B. M., & Sasseville, K. R. L. (1980). *Legionella bozemanii* sp. nov. and *Legionella dumoffi* sp. nov.: classification of two additional species of *Legionella* associated with human pneumonia. *Current Microbiology*, 4(2), 111-116.

Broome, C. V., & Fraser, D. W. (1979). Epidemiologic aspects of legionellosis. *Epidemiologic Reviews*, 1(1), 1-16.

Brüggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M., Gouyette, C.,...Buchrieser, C. (2006). Virulence strategies for infecting phagocytes deduces from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, 8(8), 1228-1240.

Buesching, W. J., Brust, R. A., & Ayers, L. W. (1983). Enhanced primary isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens by low-pH treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 17(6), 1153-1155.

- Byrne, B. & Swanson, M., S. (1998). Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infection and Immunity*, 66(7), 3029-3034.
- Campese, C., Bitar, D., Jarraud, S., Maine, C., Forey, F., Etienne, J.,...Che, D. (2011). Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France.1998-2008.*International Journal of Infectious Diseases*, 15(1), e30-e37.
- Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L.,...Buchrieser, C. (2004). Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature Genetics*.36(11), 1165-1173.
- Chen, T. T., Schapiro, J. M., & Loutit, J. (1996). Prosthetic valve endocarditis due to *Legionella pneumophila*. *The Journal of Cardiovascular Surgery (Torino)*, 37(6), 631-633.
- Cherry, W. B., Pittman, B., Harris, P. P., Hebert, G. A., Thomason, B. M., Thacker, L., & Weaver, R. E. (1978). Detection of Legionnaires' disease bacteria by direct immunofluorescent staining. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(3), 329-338.
- Cianciotto, N., Eisenstein, B. I., Engleberg, N. C.&Shuman, H. (1989). Genetics and molecular pathogenesis of *Legionella pneumophila*, an intracellular parasite of macrophages. *Molecular Biology & Medicine*, 6(5), 409-424.
- Cianciotto, N. P., & Fields, B. S. (1992). *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 5188-5191.
- Cianciotto, N. P. (2001). Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(5), 331-343.

Cindy, J. S., & Osborn, A. M. (2008). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6-20.

Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S. (1994). Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and Immunity*, 62(8), 3254-3261.

Cirillo, J. D., Cirillo, S. L. G., Yan, L., Bermudez, L. E., Falkow, S. & Tompkins, L. S. (1999). Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 67(9), 4427-4434.

Cirillo, S. L., Bermudez, L. E., El-Etr, S. H., Duhamel, G. E., & Cirillo, J. D. (2001). *Legionella pneumophila* entry gene rtxA is involved in virulence. *Infection and Immunity*, 69(1), 508-517.

Cordes, L. G., Wilkinson, H. W., Gorman, G. W., Fikes, B. J., Fraser, D. W. (1979). Atypical *Legionella*-like organisms: fastidious water-associated bacteria pathogenic for man. *Lancet*, 2(8149), 927-930.

Cunha, C. (2013). Estudo da expressão génica da *Legionella pneumophila* estirpe Paris após co-cultura em *Acanthamoeba castellanii*. Tese de mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Lisboa.

Daniels, W. B., & Grennan, H. A. (1943). Pretibial fever: an obscure disease. *The Journal of the American Medical Association*, 122(6), 361-365.

Den Boer, J. W., & Yzerman, E. P. (2004). Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23(12), 871-878.

DGS (1998). Portaria 1071/98, de 31 de dezembro: Tabela de doenças de declaração obrigatória. In Diário da República, 1ª Série B, nº 301: 7381-7382. Acedido em 2 de Novembro de 2013 em <http://www.dre.pt/pdf1s/1998/12/301B00/73817383.pdf>

Diederer, B. M., de Jong, C. M., Kluytmans, J. A., van der Zee, A., & Peeters, M. F. (2006). Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of literature. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 5), 639-642.

Diederer, B. M. (2008). *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *The Journal of Infection*, 56(1), 1-12.

Domínguez, J. A., Galí, N., Pedroso, P., Fargas, A., Padilla, E., Manterola, J. M., & Matas, L. (1998). Comparison of the Binx Legionella urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest Legionella urine antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and non concentrated urine samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2718-2722.

Dowling, J. N., Saha, A. K., Glew, R. H., (1992). Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiological Reviews*, 56(1), 32-60.

Dumoff, M. (1979). Direct in-vitro isolation of the legionnaires' disease bacterium in two fatal cases: cultural and staining characteristics. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 694-696.

ECDC (n.d.). European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). In European Center for Disease Prevention and Control. Acedido em 25 Outubro 2013 em <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ELDSNet/Pages/index.aspx>.

Edelstein, P. H., & Finegold, S. M. (1979). Use of a semiselective medium to culture *Legionella pneumophila* from contaminated lung specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(2), 141-143.

Edelstein, P. H. (1982). Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(4), 697-699.

Edelstein, P. H. (1987). The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. *Seminars in Respiratory Infections*, 2(4), 235-241.

Edelstein, P. H. (1993). Legionnaires' disease. *Clinical Infectious Diseases*, 16(6), 741-749.

Edelstein, P. H. (1998). Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires' disease: time for a change. *Annals of Internal Medicine*, 129(4), 328-330.

Edelstein, P. H. (2006). Clinical features of Legionnaires' disease: a selected review. In N. P. Cianciotto, Y. Kwaik, P.S. Edelstein, B. S. Fields, D. F. Geary, T. Harrison, T. G. & Swanson, M. S. (Eds.), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. (pp. 3-7). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Engleberg, N. C., Carter, C., Weber, D. R., Cianciotto, N. P., & Eisenstein, B. I. (1989). DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infection and Immunity*, 57(4), 1263-1270.

Farshy, C. E., Cruce, D. D., Klein, G. C., Wilkinson, H. W., & Feeley, J. C. (1979). Immunoglobulin specificity of the microagglutination test for the Legionnaires' disease bacterium. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 690.

Feeley, J. C., Gibson, R. J., Gorman, G. W., Langford, N. C., Rasheed, J. K., Mackel, D. C., & Baine, W. B. (1979). Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(4), 437-441.

Fields, B. S., Shotts, E. B. Jr., Feeley, J. C., Gorman, G. W., & Martin, W. T. (1984). Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrhymentha pyriformis*. *Applied Environmental Microbiology*, 47(3), 467-471.

Fields, B. S. (1996). The molecular ecology of *legionellae*. *Trends in Microbiology*, 4(7), 286-290.

Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 506-526. doi:10.1128/CMR.15.3.506-526.2002

Garduño, R. A., Garduño, E., & Hoffman, P. S. (1998). Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infection and Immunity*, 66(10), 4602-4610.

Garduño, R. A., Garduño, E., Hilltz, M. F., & Hoffman, P. S. (2002). Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and Immunity*, 70(11), 6273-6283.

Garduño, R. A., Chong, A., Nasrallah, G. K., & Allan, D. S. (2011). *Frontiers in Microbiology*, 2(122). doi: 10.3389/fmicb.2011.00122

Gentle, A., Anastasopoulos, F., & McBrien, N.A. (2001). High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques*, 31(3), 502-508.

Glick, T. H., Gregg, M. B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W. W. Jr., & Kassanoff, I. (1978). Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiological aspects. *American Journal of Epidemiology*, 107(2), 149-160.

Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Cazalet, C. & Buchrieser, C. (2011). Comparative and functional genomics of *Legionella* identified eukaryotic like proteins as key players in host-pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 2(208). doi:10.3389/fmicb.2011.00208

Gosting, L. H., Cabrian, K., Sturge, J. C., & Goldstein, L. C. (1984). Identification of a species-specific antigen in *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(6), 1031-1035.

Grimont, P. A. (1986). Rapid methods for identification of *Legionella* – a review. *Israel Journal of Medical Science*, 22(10), 697-702.

Guerra, L., Pereira, J. D., Fernandes, J. L., Vargas, J. E., & Carneiro, E. L. (1981). Um caso de doença dos legionários em Portugal. *O Médico*, 99, 581-588.

Hagele, S., Kohler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., & Steinert, M. (2000). *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cellular Microbiology*, 2(2), 165–171.

Hammer, B., K., Tateda, E., S. & Swanson, M.,S. (2002). A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*. 44(1), 107-118.

Harb, O. S., & Abu Kwaik, T. (2000). Essential role for the *Legionella pneumophila* rep helicase homologue in intracellular infection of mammalian cells. *Infection and Immunity*, 68(12), 6970-6978.

Harrison, T. G., & Taylor, A. G. (1988). The diagnosis of Legionnaires' disease by estimation of antibody levels. In T. G. Harrison, & A. G. Taylor (Eds.), *A Laboratory Manual for Legionella* (pp. 113-135). Chichester: John Wiley & Sons.

Harrison, T. G. (1997). *Legionella*. In: A. M. Emmerson, P. M. Hawkey, & S. H. Gillespie (Eds.), *Principles and practice of clinical bacteriology* (pp. 349-366). Chichester: John Wiley & Sons.

Hayden, R. T., Uhl, J. R., Qian, X., Hopkins, M. K., Aubry, M. C., Limper, A. H. & Cockerill, F. R. (2001). Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ

hybridization, direct fluorescence antigen detection and culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2618-2626.

Hebert, G. A., Steigerwalt, A. G., & Brenner, D. J. (1980). *Legionella micdadei* species nova: classification of a third species of *Legionella* associated with human pneumonia. *Current Microbiology*, 3(5), 255-257.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (New York)*, 11(9), 1026-1030.

Horwitz, M. A., Silverstein, S. C. (1980). Interaction of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. I *Legionella pneumophila* resists killing by polymorphonuclear leukocytes antibody and complement. *Journal of Experimental Medicine*, 153(2), 386-397.

Hu, J., Horn, M., Limaye, A. P., Gautam, R. K., & Fritsche, T. R. (2002). Direct detection of *legionellae* in respiratory tract specimens by using fluorescence in situ hybridization. In R. Marre, Y. Abu Kwaik, C. Bartlett, N. P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch,...P. C. Lück (Eds.) *Legionella* (pp. 221-224). Washington DC: ASM Press.

Huang, B., Yuan, Z., Heron, B. A., Gray, B. R., Eglezos, S., Bates, J. R., & Savill, J. (2006). Distribution of 19 major virulence genes in *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and water in Queensland, Australia. *Journal of Medical Microbiology*, 55(8), 993-997.

Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S., & Bhakdi, S. (1995). Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *legionellae* in bronchoalveolar fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1247-1252.

Joshi, A. D., & Swanson, M. S. (1999). Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. *Infection and Immunity*, 67(8), 4134-4142.

Katz, S. M., & Hammel, J. M. (1987). The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 17(3), 150-156.

Kohler, R. B., Zimmerman, S. E., Wilson, E., Allen, S. D., Edelstein, P. H., Wheat, L. J., & White, A. (1981). Rapid radioimmunoassay diagnosis of legionnaires' disease: detection and partial characterization of urinary antigen. *Annals of Internal Medicine*, 94(5), 601-605.

doi: 10.7326/0003-4819-94-5-601

Kohler, R. B., Winn, W. C., & Wheat, L. J. (1984). Onset and duration of urinary antigen excretion in legionnaires' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(4), 605-607.

Kohne, D. E., Speicherwald, A. G., & Brenner, D. J. (1984). Nucleic acid probe specific for members of the genus *Legionella*. In: C. Thornsberry, A. Balows, J. C. Feeley, W. Jakubowski (Eds.). *Legionella Proceedings of the second international symposium* (pp. 107-108). Washington D. C., EUA: American Society for Microbiology.

Kwaik, A. Y., Gao, L. Y., Stone, B. J., Venkataraman, C., & Harb, O. S. (1998). Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3127-3133.

Lawrence, C., Reyrolle, M., Dubrou, S., Forey, F., Decludt, B., Goulvestre, C.,...Nauciel, C. (1999). Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8), 2652-2655.

Lee, T. C., Vickers, R. M., Yu, V. L., & Wagener, M. M. (1993). Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(10), 2764-2768.

Lisby, G., & Dessau, R. (1994). Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13(3), 225-231.

Liu, W. & Saint, D. A. (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry*, 302(1), 52-59.

Livak, K. J., Flood, S. J. A., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications*, 4(6), 357-362.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Loens, K., Beck, T., Goossens, H., Ursi, D., Overdijk, M., Sillekens, P., & Ieven, M. (2006). Development of conventional and real-time NASBA® for the detection of *Legionella* species in respiratory specimens. *Journal of Microbiology Methods*, 67(3), 408-415.

Lowry, P. W., & Tompkins, L. S. (1993). Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. *American Journal of Infection Control*, 21(1), 21-27.

Lück, P. C., Helbig, J. H., & Schuppler, M. (2002). Epidemiology and laboratory diagnosis of *Legionella* infections. *Journal of Laboratory Medicine*, 26(3-4), 174-182.

Lurie-Weinberger, M. N., Gomez-Valero, L., Merault, N., Glöckner, G., Buchrieser, C., & Gophna, U. (2010). The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(7), 470-481.

MacDonell, M. T., & Colwell, R. R. (1987). The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Research*, 15(3), 1335.

Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J., & Atlas, R. M. (1990). Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Molecular and Cell Probes*, 4(3), 175-187.

Maiwald, M., Helbig, J. H., & Luck, P. C. (1998). Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *Journal of Microbiological Methods*, 33(1), 59-79.

Malinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T., & Palva, A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 149(1), 269-277.

Marques, M.T. (1999). Contribuição para o estudo do género *Legionella* e a sua ocorrência em Portugal. (Tese de doutoramento). Disponível nos arquivos do Instituto Bacteriológico Câmara Pestana. Tomo XXIII:89-218.

Marston, B. J., Lipman, H. B. & Breiman, R. F. (1994). Surveillance for Legionnaires' disease: risk factors for morbidity and mortality. *Archives of Internal Medicine*, 154(21), 2417-2422.

McCabe, R. E., Baldwin, J. C., McGregor, C. A., Miller, D. C., & Vosti, K. L. (1984). Prosthetic valve endocarditis cause by *Legionella pneumophila*. *Annals of Internal Medicine*, 100(4), 525-527.

McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A., & Dowdle, W. R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England Journal of Medicine*, 297(22), 1197-1203.

- McDade, J. E., Brenner, D. J., & Bozeman, F. M. (1979). Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 659-661.
- Miles, A., Misra, S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(6), 732-749.
- Miyake, M., Watanabe, T., Koike, H., Molmeret, M., Imai, Y. & Kwaik, A. (2005). Characterization of *Legionella pneumophila* *pmiA*, a gene essential for infectivity of protozoa and macrophages. *Infection and Immunity*. 73(10), 6272-6282.
- Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K. & Yoshida, S. (1997). Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *legionellae* in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2489-2494.
- Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L., & Kwaik, Y. A. (2004). Disruption of the phagosomal membrane and egress of *Legionella pneumophila* into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and *Acanthamoeba polyphaga*. *Infection and Immunity*, 72(7), 4040-4051.
doi:10.1128/IAI.72.7.4040-4051.2004
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Abu, & Kwaik, Y. (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, 71(1), 20-28.
doi:10.1128/AEM.71.1.20-28.2005
- Molofsky, A. B., & Swanson, M. S. (2004). Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology*, 53(1), 29-40.
doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04129.x
- Morrill, W. E., Barbaree, J. M., Fields, B. S., Sanden, G. N., & Martin, W. T. (1990). Increased recovery of *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 616-618.

Morris, G. K., Patton, C. M., Feeley, J. C., Johnson, S. E., Gorman, G., Martin, W. T.,...Mackel, D. C. (1979). Isolation of legionnaires' disease bacterium from environmental samples. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 664-666.

Morrison, T. B., Weis, J. J., & Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, 24(6), 954-962.

Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R., Dobbie, Z. (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques*, 32(6), 1372-1379.

Munro, R., Neville, S., Daley, D., & Mercer, J. (1994). Microbiological aspects of an outbreak of legionnaires' disease in south western Sidney. *Pathology*, 26(1), 48-51.

Murdoch, D. R., Walford, E. J., Jennings, L. C., Light, G. J., Schousboe, M. I., Cheresky, A. Y.,...Town, G. I. (1996). Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 23(3), 475-480.

Murdoch, D. R. (2003). Diagnosis of *Legionella* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 36(1), 64-69.

Newton, H. J., Ang, D. K., Van Driel, I. R., Hartland, E. L. (2010). Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 274-298.

doi:10.1128/CMR.00052-09

Nguyen, M. H., Stout, J. E., & Yu, V. L. (1991). Legionellosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 5(3), 561-584.

Ohno, A., Kato, N., Sakamoto, R., Kimura, S., & Yamaguchi, K. (2008). Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella*

pneumophila and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4585-4588.

Osterholm, M. T., Chin, T. D., Osborne, D. O., Dull, H. B., Dean, A. G., Fraser, D. W. & Hall, W. N. (1983). A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *American Journal of Epidemiology*, 117(1), 60-67.

Park, M., Yun, S. T., Kim, M. S., Chun, J., & Ahn, T. I. (2004). Phylogenetic characterization of Legionella-like endosymbiotic X-bacteria in *Amoeba proteus*: a proposal for 'Candidatus *Legionella jeonii*' sp. nov.. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1252–1263.

Peirson, S.N., Butler, J.N. & Foster, R.G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*. 31(14), e73.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.

Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: S. A. Bustin (Ed.). *A-Z of quantitative PCR* (pp. 87-112). La Jolla, EUA: IUL Biotechnology Series, International University Line.

Plouffe, J. F., File, T. M., Breiman, R. F., Hackman, B. A., Salstrom, S. J., Marston, B. J., & Fields, B. S. (1995). Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. *Clinical Infectious Diseases*, 20(5), 1286–91.

Price, C., & Abu Kwaik, Y. (2012). Amoebae and mammals deliver protein-rich Atkins diet meals to *Legionella*. *Microbe*, 7(11), 506–513.

Rigby, E. W., Plouffe, J. F., Hackman, B. A., Hill, D. S., Benson, R. F., & Breiman, R. F. (1997). Stability of *Legionella* urinary antigens over time. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 28(1), 1-3.

- Roig, J., Aguilar, X., Ruiz, Z., Domingo, C., Mesalles, E., Manterola J, & Morera, J. (1991). Comparative study of *Legionella pneumophila* and other nosocomial-acquired pneumonias. *Chest*, 99(2), 344-350.
- Roig, J., Domingo, C., & Morera, J. (1994). Legionnaires' disease. *Chest*, 105(6), 1817-1825.
- Roig, J. & Rello J. (2003). Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(5), 1119-1129.
- Rossier, O., & Cianciotto, N. P. (2001). Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 69(4), 2092-2098.
- Rossier, O., Starkenburg, S. R., & Cianciotto, N. P. (2004). *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of legionnaires' disease pneumonia. *Infection and Immunity*, 72(1), 310-321.
- Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*, 33(12), 1179-1183.
- Rowbotham, T. J. (1998). Isolation of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from human feces with use of amebic co-cultures. *Clinical Infectious Diseases*, 26(2), 502-503. doi:10.1086/517095
- Ruckdeschel, G., & Ehret, W. (1993). *Legionella* infection. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd*, 61, 207-302.
- Samrakandi, M. M., Cirillo, S. L., Ridenour, D. A., Bermudez, L. E., & Cirillo, J. D. (2002). Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1352-1362.

- Segal, G. & Shuman, A. H. (1998). Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Molecular Microbiology*, 30(1), 197–208.
- Shands, K. N., Ho, J. L., Meyer, R. D., Gorman, G. W., Edelstein, P. H., Mallison, G. F., Finegold, S. M., & Fraser, D. W. (1985). Potable water as a source of legionnaires' disease. *The Journal of the American Medical Association*, 253(10), 1412-1416.
- Smith, C. J., Nedwell, D. B., Dong, L. F., & Osborn, A. M. (2007). Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3612-3622.
- Sopena, N., Sabrià-Leal, M., Pedro-Botet, M. L., Padilla, E., Dominguez, J., Morera, J., & Tudela, P. (1998). Comparative study of the clinical presentation of *Legionella pneumonia* and other community- acquired pneumonias. *Chest*, 113(5), 1195-1200.
- Starnbach, M. N., Falkow, S., & Tompkins, L. S. (1989). Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(6), 1257-1261.
- Steele, T. W. (1989). Legionnaires' disease in South Australia, 1979-1988. *Medical Journal of Australia*, 151(6), 325-326.
- Steinert, M., Hentschel, U., & Hacker, J. (2002). *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 149–162.
- Stout, J. E., & Yu, V. L. (1997). Legionellosis. *The New England Journal of Medicine*, 337(10), 682-687.
- Stout, J. E., Brenner, C., & Muder, R. R. (2000). Legionnaires' disease in a newly constructed long-term care facility. *Journal of American Geriatrics Society*, 48(12), 1589-1592.

Swanson, M. S., & Hammer, B. K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology*, 54, 567–613.

Tatlock, H. (1944). A Rickettsia-like organism recovered from guinea pigs. *Experimental Biology and Medicine*, 57(1), 95-99.

Terranova, W., Cohen, M. L., & Fraser, D. W. (1978). 1974 outbreak of legionnaires' disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. *Lancet*, 2(8081), 122-124.

Thacker, S. B., Bennett, J. V., Tsai, T. F., Fraser, D. W., McDade, J. E., Shepard, C. C. & Eickhoff, T. C. (1978). An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the legionnaires' disease bacterium. *The Journal of Infectious Diseases*, 138(4), 512-519.

Tilton, R. C. (1979). Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 697-698.

Tobin, J. O., Swann, R. A., & Bartlett, C. L. (1981). Isolation of *Legionella pneumophila* from water systems: methods and preliminary results. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 282(6263), 515-517.

Tompkins, L. S., Roessler, B. J., Redd, S. C., Markowitz, L. E., & Cohen, M. L. (1988). *Legionella* prosthetic-valve endocarditis. *The New England Journal of Medicine*, 318(9), 530-535.

Ursi, J. P., Ursi, D., Ieven, M., & Pattyn, S. R. (1992). Utility of an internal control for the polymerase chain reaction: Application to detection of *Mycoplasma pneumonia* in clinical specimens. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 100(7), 635–639.

Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151–159.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034-research0034.11.

Wadowsky, R.M., & Yee, R.B. (1981). Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(5), 768-772.

Wever, P. C., Yzerman, E. P. F., Kuijper, E. J., Speelman, P., & Dankert, J. (2000). Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2738-2739.
doi:10.1128/JCM.41.5.2265.2003

White, R. A., Blainey, P. C., Fan, C. H. & Quake, S. R. (2009). Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 10(116).doi:10.1186/1471-2164-10-116

Wilkinson, H. W., Reingold, A. L., Brake, B. J., McGiboney, D. L., Gorman, G. W., & Broome, C. V. (1983). Reactivity of serum from patients with suspected legionellosis against 29 antigens of *Legionellaceae* and *Legionella*-like organisms by indirect immunofluorescence assay. *The Journal of Infectious Diseases*, 147(1), 23-31.

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.

World Health Organization (2000). Legionnaires' disease, Europe, 1999. *Weekly Epidemiology Records*, 75(43), 345-352.

World Health Organization (2007). Legionella and the prevention of legionellosis. In WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Acedido em 5 de Outubro de 2013 em http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf.

Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., & Cheresky, A. (2002). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(1), 127–128.

Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., & Stewart, N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7(85).

Zuravleff, J. J., Yu, V. L., Shonnard, J. W., Davis, B. K., & Rihs, J. D. (1983). Diagnosis of legionnaires' disease: an update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture. *JAMA*, 250(15), 1981-1985.

Anexos

Anexo I - Protocolos de extracção de ARN, “DNase” e de conversão em ADN complementar

1) Extracção e purificação de ARN total

PureLink[®] RNA Mini Kit (Invitrogen)

Lise

Adicionar 1 ml de Trizol (Invitrogen) a cada uma das amostras e homogeneizar, com pipeta, de forma a auxiliar o processo de lise celular.

Separação de fases

Incubar o lisado (T.A., 5 minutos), adicionar 200 µl de clorofórmio (Applichem) e agitar vigorosamente (15 segundos). Incubar (T.A., 3 minutos), centrifugar (12.000 x g, 15 minutos, 4°C) e transferir a fase aquosa superior (~ 600 µl) para novo microtubo de 1,5 ml (livre de “DNases e RNases”). Adicionar igual volume de etanol a 70% (Panreac) e homogeneizar com auxílio do vortex.

Retenção, lavagem e eluição

Transferir 600 µl de amostra para uma coluna, com respectivo tubo colector, centrifugar (12.000 x g, 15 segundos) e descartar o eluído. Repetir o processo para o volume de amostra restante. Adicionar 700 µl de “Wash buffer I”, centrifugar (12.000 x g, 15 segundos) e transferir a coluna para novo tubo colector. Adicionar 500 µl de “Wash buffer II”, centrifugar (12.000 x g, 15 segundos) e descartar o eluído. Repetir o processo. Descartar o tubo colector e colocar a coluna num microtubo de 1,5 ml (livre de “DNases e RNases”). Adicionar 50 µl de água, livre de “RNases”, incubar (T.A., 1 minuto) e centrifugar (12,000 xg, 2 minutos). Repetir o processo utilizando os 50 µl eluídos.

Armazenamento

Conservar a -80°C.

2) Tratamento com “DNase”

TURBO DNA-free™ Kit (Ambion)

Calcular o volume de ARN para uma concentração final de 200 ng/μl. Pipetar tampão “Turbo DNase” 10x (2 μl), “Turbo DNase” (1,5 μl) e o volume de ARN calculado para microtubo de 200 μl (livre de “DNases e RNases”). Perfazer o volume com água ultra pura, até aos 20 μl, e incubar no termociclador (37°C, 30 minutos). Adicionar 4 μl de reagente de inactivação e homogeneizar. Incubar (T.A., 10 minutos) e agitar ocasionalmente. Centrifugar (10.000 x g, 1,5 minutos) e transferir 10 μl do sobrenadante para novo microtubo (livre de “DNases e RNases”). Rejeitar o sedimento. Armazenar a -20°C.

3) Síntese de ADN complementar

Superscript III® First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

Pipetar 10 μl de ARN total (200 ng/μl), 1 μl de dNTP's (50 μM) e 1 μl hexâmeros aleatórios (Roche) para microtubo de 200 μl (livre de “DNases e RNases”). Perfazer o volume com água até aos 13 μl e incubar no termociclador (65°C, 5 minutos). Colocar em gelo (1 minuto) e centrifugar brevemente (10.000 x g, 5 segundos). Pipetar, para o mesmo microtubo, 4 μl de tampão “*First Strand*” 5x, 1 μl de DTT (0,1 M), 1 μl de RNaseOUT (40 U/μl) e 1 μl “Superscript III RT”(200 U/μl). Homogeneizar e incubar a mistura (25°C, 5 minutos; 55°C, 60 minutos). Inactivar a reacção pelo aquecimento (70°C, 15 minutos). Armazenar a -20°C.

Anexo II - Meios de cultura

a) Meios de cultura líquido e sólido para inoculação de *Legionella*

AYE	
Formulação	g/L
ACES (Applichem)	10
Extracto de levedura (Biokar Diagnostics)	10
L – Cisteína (Applichem)	0,4
Pirofosfato de ferro (Sigma)	0,25
Indicações	
<ol style="list-style-type: none">1) Pesar e dissolver o ACES e o Extracto de levedura em 950 ml de água destilada;2) Ajustar o pH a 6,9 com uma solução de NaOH [1M];3) Aquecer o Pirofosfato de ferro em 50 ml de água destilada, até completa dissolução;4) Deixar arrefecer até à T.A.;5) Adicionar a L – Cisteína e a solução de Pirofosfato de ferro;6) Esterilizar por filtração (0,22 µm) e testar a esterilidade por incubação de 3 ml de meio, a 37° C, durante uma semana.	

Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE – α)	
Formulação	g/100 ml
Legionella CYE Agar Base (Oxoid)	2,77
Legionella BCYE Growth Supplement (Oxoid)	1 frasco
Indicações	
<ol style="list-style-type: none">1) Pesar e dissolver o Agar Base em 100 ml de água destilada;2) Aquecer até completa dissolução;3) Autoclavar a 120°C durante 20 minutos;4) Deixar arrefecer até aos 55°C;5) Adicionar o suplemento e homogeneizar com o Agar Base;6) Distribuir em placas de Petri (\pm 20 ml) e testar de esterilidade do lote (37°C, 72 h);7) Conservar a 4°C.	

Buffered Charcoal Yeast Extract c/ NaCl (BCYE – α + NaCl)

Formulação	g/100 ml
Legionella CYE Agar Base (Oxoid)	2,77
Cloreto de Sódio (NaCl) [0,4 M] (Merck)	2,34
Legionella BCYE Growth Supplement (Oxoid)	1 frasco

Indicações

- 1) Pesar e dissolver o Agar Base em 100 ml de água destilada;
 - 2) Aquecer até completa dissolução;
 - 3) Autoclavar a 120°C durante 20 minutos;
 - 4) Deixar arrefecer até aos 55°C;
 - 5) Adicionar o suplemento e homogeneizar com o Agar Base;
 - 6) Distribuir em placas de Petri (\pm 20 ml) e testar de esterilidade do lote (37°C, 72 h);
 - 7) Conservar a 4°C.
-

b) Meios de cultura para a manutenção e criopreservação de *Acanthamoeba castellanii*

Meio de Multiplicação das amibas - PYG

Formulação	g/l
Citrato trissódico (Applichem)	1
Tryptona (Biokar Diagnostics)	20
Extracto de levedura (Biokar Diagnostics)	2
Glucose (Applichem)	18

Soluções	Volume (ml)
Cloreto de cálcio (CaCl_2) – [0,05 M] (Merck)	8
Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) - [0,05 M] (Merck)	10
Sulfato de Magnésio (MgSO_4) - [0,4 M] (Merck)	10
Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4) - [0,25 M] (Applichem)	10
Pirofosfato de ferro ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$) - [0,005 M] (Sigma)	10

Indicações

- 1) Pesar e dissolver todos os compostos descritos na formulação em 950 ml de água destilada;
 - 2) Adicionar o volume correspondente de cada uma das soluções;
 - 3) Esterilizar por filtração (0,22 μm) e testar a esterilidade por incubação de 3 ml de meio, a 37° C, durante uma semana.
-

Meio infecção (MI)

Formulação	g/l
Citrato trissódico (Applichem)	1

Soluções	Volume (ml)
Cloreto de cálcio (CaCl_2) – [0,05 M] (Merck)	8
Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) - [0,05 M] (Merck)	10
Sulfato de Magnésio (MgSO_4) - [0,4 M] (Merck)	10
Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4) - [0,25 M] (Applichem)	10
Pirofosfato de ferro ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$) - [0,005 M] (Sigma)	10

Indicações

- 1) Pesar e dissolver o Citrato trissódico em 950 ml de água destilada;
 - 2) Adicionar o volume correspondente de cada uma das soluções;
 - 3) Esterilizar por filtração (0,22 μm) e testar a esterilidade por incubação de 3 ml de meio, a 37° C, durante uma semana.
-

Meio de congelação

Formulação	%
Dimetilsulfóxido (DMSO) (AppliChem)	10
Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma)	90

Indicações

- 1) Preparar uma mistura contendo 10% de DMSO e 90% de SFB;
- 2) Esterilizar por filtração (0,22 μm);
- 3) Preservar a -80°C.

Nota: O SFB deverá ser descomplementado previamente à sua utilização (56°C, 30 minutos).

Para tal, descongelar o SFB, fraccionar em tubos de 15 ml, colocar em banho-térmico (56°C, 30 minutos) e congelar a - 80°C.

Anexo III - Manutenção e congelamento da amiba *Acanthamoeba castellanii*

a) Descongelamento e manutenção das culturas de *Acanthamoeba castellanii*

As células de *Acanthamoeba castellanii* deverão ser descongeladas e expandidas de forma a normalizar o seu crescimento, processo este que poderá levar entre 5 a 7 dias.

Após descongelamento da alíquota de amibas em banho-térmico, a 37°C, procedeu-se à lavagem com 7 ml de Meio de Multiplicação (MM). Após 10 minutos de espera, centrifugaram-se as células (1000 rpm, 10 minutos), decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” com 3 ml de MM, os quais foram posteriormente distribuídos por três frascos de 25 cm². Perfez-se o volume até aos 6 ml, com MM, e incubou-se à temperatura ambiente.

Entre 3 a 4 dias após a descongelamento das células, pode observar-se uma monocamada confluyente de amibas, indicação para que se procedesse à sua sub-cultura. Para tal, procedeu-se à remoção do meio e à lavagem das amibas (3x) com 2 ml de MM, utilizando os últimos 2 ml para ressuspender a monocamada celular. Por fim, transferiram-se 300 µl da suspensão de amibas para dois novos frascos, perfez-se o volume até aos 6 ml com MM e incubou-se à temperatura ambiente.

Todas as passagens foram devidamente registadas.

b) Congelamento das culturas de *Acanthamoeba castellanii*

A partir de três frascos de cultura, com 48 h de crescimento, procedeu-se à remoção do meio e à lavagem das amibas (3x) com 2 ml de MM, utilizando-se os últimos 2 ml para ressuspensão da cultura. Transferiu-se o volume total dos três frascos (3 x 2 ml) para um tubo de 15 ml estéril, centrifugou-se (1000 rpm, 10 minutos), lavou-se o “pellet” com MM (10 ml) e procedeu-se a nova centrifugação (1000 rpm, 10 minutos). Decantou-se o sobrenadante, homogeneizou-se o sedimento com 2 ml de meio de congelamento e distribuiu-se em alíquotas de 1 ml. Congelaram-se as células, a -80°C, até posterior utilização.

Anexo IV - Electroforese e amplificação do gene *mip*

a) Electroforese em gel de agarose

A electroforese foi realizada em gel de 1,5% de agarose (Citomed), em tampão TBE 1X, aplicando 5 µl de extracto e 2 µl de tampão azul de bromofenol. Os géis foram corridos na presença de Brometo de Etídeo (BioRad), a uma concentração de 0,006% (v/v), e a voltagem constante (100 V) e com marcador de peso molecular 100 pb. A visualização dos produtos amplificados foi feita sob luz UV.

b) Amplificação do gene *mip* (“macrophage infectivity potentiator”)

Protocolo realizado de acordo com:

Sequence-Based Typing (SBT) protocol for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* (Version 5.0)

Anexo V - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores

Gene	Função	Posição do gene no genoma	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (5' 3')	Posição do oligonucleótido no gene	Amplicação (pb)
<i>lpp1612b</i>	C – Terminal da proteína SidB	c1798220 - 1797582	FW CGATGATGCTGTGATTCCACA RV CAACCCTGGTTTCGAAGAG	1797936 -1797916 1797792 -1797811	145
<i>lpp1330</i>	Proteína hipotética (Sem função conhecida)	1485268 - 1486245	FW ATAAAGGTCGCGGTGATCGT RV CCAGTGTAGCGCGCTCTTC	1485454 -1485473 1485593 -1485573	150
<i>lpp1316</i>	Proteína LspG (Via secretória tipo II)	c1469589 - 1469167	FW CGGATGAAGCCCGTAAAGTC RV TTGGAACAGGATTGCTTGTAGGT	1469489 -1469470 1469340 -1469362	150
<i>lpp1900</i>	Proteína hipotética (Sem função conhecida)	2149421 - 2152066	FW ACAGATGCTATAGGCGGGTATTG RV GCCCATGACGGGTATGTTTC	2150555 -2150577 2150714 -2150695	160
<i>lpp1177</i>	Proteína hipotética (Sem função conhecida)	c1305825 - 1304470	FW TGCATGATGCTGCTTGTGGT RV TAGGCCGCATACCCCACTAC	1305188 -1305169 1305044 -1305063	145
<i>lpp0845</i>	Regulador global de CsrA	947459 - 947668	FW TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT RV CAGATTCTTTTTCTTGTGTATGCG	947478 -947500 947645 -947621	165
<i>lpp0972</i>	Semelhante à proteína <i>enhA</i>	1076650 - 1077247	FW CCTGAGAAAAGACAGGCCACA RV GTCTGCCAACGTCCTCACAA	1076797 -1076817 1076941 -1076922	145
<i>lpp2607</i>	Proteína hipotética (Sem função conhecida)	c2971433 - 2970606	FW TACAACGCGGTAACGAAGGAT RV GCCATGTCTTTGCCTAACCGT	2970994 -2970974 2970835 -2970855	160
<i>lpp1170</i>	Proteína reguladora (Domínios GGDEF e EAL)	c1304318 - 1302012	FW ATTGAAGCGCTGCATACCCT RV TTATTAGCGCCTGCATGCAC	1303949 -1303930 1303795 -1303814	155
<i>lpp1315</i>	Proteína LspH (Via secretória tipo II)	c1469180 - 1468695	FW TTTAGAAAGCAGCACCCCTTGG RV AAGGCTAATCACAACGTTTTTGG	1469007 -1468987 1468863 -1468885	145
<i>lpp0094</i>	Proteína hipotética (Sem função conhecida)	97375 - 98142	FW TAATCCTCTGGTGGGCTCGA RV TTTCCACATCGGTGATACGAAC	97449 -97468 97606 -97585	158